



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : G01N 33/68, 33/564, C07K 7/04	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/11738 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. Mai 1994 (26.05.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/03175 (22) Internationales Anmeldedatum: 12. November 1993 (12.11.93) (30) Prioritätsdaten: P 42 38 416.8 13. November 1992 (13.11.92) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; D-Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RÖTZSCHKE, Olaf [DE/US]; FALK, Kirsten [DE/US]; Lincoln Parkway 42, Apartment 2, Sommerville, MA 02143 (US). STEVANOVIĆ, Stefan [DE/DE]; Luisenstrasse 47, D-68723 Plankstadt (DE). JUNG, Günther [DE/DE]; Ob der Grafenhalde 5, D-72076 Tübingen (DE). RAMMENSEE, Hans-Georg [DE/DE]; Sommerhalde 3, D-72070 Tübingen (DE).		(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw. ; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: DETERMINATION OF PEPTIDE MOTIFS ON MHC MOLECULES (54) Bezeichnung: BESTIMMUNG VON PEPTIDMOTIVEN AUF MHC-MOLEKÜLEN (57) Abstract A process is disclosed for determining allele-specific peptide motifs on molecules of the major histocompatibility complex (MHC) of classes (I) and (II), as well as the peptide motifs obtained by this process. Also disclosed is the used of said peptide motifs for preparing a diagnostic or therapeutical agent. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von allelspezifischen Peptidmotiven auf Molekülen des Major Histocompatibility Complex (MHC) der Klassen (I) und (II) sowie die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Peptidmotive. Weiterhin wird die Verwendung der erfindungsgemäßen Peptidmotive zur Herstellung eines diagnostischen oder therapeutischen Mittels offenbart.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Marokkanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentralafrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowakeien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TC	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Bestimmung von Peptidmotiven auf MHC-Molekülen

B e s c h r e i b u n g

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Peptidmotiven bzw. -epitopen auf Molekülen des Major Histocompatibility Complex (MHC) sowie die dadurch bestimmten Peptidmotive und ihre Verwendung zur Herstellung eines diagnostischen oder therapeutischen Mittels.

Die cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erkennen antigene Peptid epitope in Verbindung mit MHC-kodierten Molekülen. Dieses Phänomen wird als MHC-Restriktion bezeichnet (1-5). Die Kristallographie von menschlichen MHC Klasse I-Molekülen, HLA-2 und Aw68, ergab einen Spalt, der durch die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen der schweren Ketten gebildet wird (3,6). Man nimmt an, daß dieser Spalt die Bindestelle für antigene Peptid epitope ist, da beide Kristalle Strukturen von Peptidgröße enthielten, die nicht mit MHC-Sequenzen kompatibel waren und sich an diesem Spalt befanden (6).

Es wird angenommen, daß diese Peptide von intrazellulären Proteinen stammen und an der Zelloberfläche präsentiert werden, um den cytotoxischen T-Lymphozyten zu erlauben, die Zellen auf abnormale Eigenschaften zu testen. Es wurden bereits MHC-assoziierte Peptide, die T-Zellepitope repräsentieren, aus normalen oder virusinfizierten Zellen extrahiert (2,4,5,7,8). Auf entsprechende Weise können auch Antigene, die durch die MHC Klasse II restringierten T-Zellen erkannt werden, durch künstliche Peptide nachgeahmt werden (9), und MHC-assoziierte antigene Peptide wurden von MHC Klasse II-Molekülen eluiert (10). Aufgrund ihrer Position in der Mitte von trimolekularen Komplexen, die aus T-Zellrezeptor, Peptid

und MHC-Molekül bestehen (11), sind die T-Zellepitope ein zentraler Punkt des spezifischen Immunsystems und somit besteht ein großes Bedürfnis nach dem Verständnis der Gesetzmäßigkeiten ihres Auftretens sowie nach einem Bestimmungsverfahren (12-15).

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung von allelspezifischen Peptidmotiven auf Molekülen des Major Histocompatibility Complex (MHC) der Klassen I oder II, wobei man

- (a) durch Aufschluß von Zellen, die MHC-Moleküle enthalten, einen Zellextrakt erzeugt,
- (b) MHC-Moleküle mit den darauf befindlichen Peptidmischungen durch Immunpräzipitation aus dem Zellextrakt abtrennt,
- (c) die Peptidmischungen von MHC-Molekülen und sonstigen Proteinbestandteilen abtrennt,
- (d) einzelne Peptide oder/und ein Gemisch davon sequenziert, und
- (e) aus den erhaltenen Informationen, insbesondere aus der Sequenzierung eines Gemisches, oder aus der Sequenzierung einer Reihe von Einzelpeptiden, das allelspezifische Peptidmotiv ableitet,

welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man Peptidmotive auf Molekülen bestimmt, die aus der Gruppe, bestehend aus HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11, HLA-A24, HLA-A31, HLA-A33, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B*2702, HLA-B*3501, HLA-B*3503, HLA-B37, HLA-B38, HLA-B*3901, HLA-B*3902, HLA-B*5101, HLA-B*5102, HLA-B*5103, HLA-B*5201, HLA-B58, HLA-B60, HLA-B61, HLA-B62, HLA-B78, HLA-Cw*0301, HLA-Cw*0401, HLA-Cw*0602, HLA-Cw*0702, HLA-Cw4, HLA-Cw6, HLA-Cw7, HLA-DRB1*0101, DRB1*1201, HLA-DR4w14, HLA-DR17, HLA-DRw52, HLA-DPW2, HLA-DPB1*0401, HLA-DQB1*0301, HLA-DQw1, HLA-DR1, HLA-DR3 und HLA-DR5 ausgewählt sind.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden Peptidmotive bestimmt, welche die Gesetzmäßigkeiten beinhalten, nach denen MHC-Moleküle Peptide auswählen und präsentieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann sowohl mit MHC-Molekülen der Klasse I als auch mit MHC-Molekülen der Klasse II durchgeführt werden, wobei MHC-Moleküle der Klasse I bevorzugt sind. Die Peptidmotive HLA-A, HLA-B und HLA-C sind Liganden für MHC-Moleküle der Klasse I. Die Peptidmotive HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP sind Liganden für MHC-Moleküle der Klasse II.

Bei der Immunpräzipitation der MHC-Moleküle durch das erfindungsgemäße Verfahren werden günstigerweise Antikörper verwendet, die für die jeweils gewünschten MHC-Moleküle spezifisch sind. Zur Bestimmung von H-2K^d- oder H-2D^b-Molekülen werden beispielsweise K^d-spezifische Antikörper (25) oder D^b-spezifische Antikörper (26) verwendet. Vorzugsweise verwendet man monoklonale Antikörper, es ist jedoch auch die Verwendung eines entsprechend gereinigten polyklonalen Antiserums möglich. Antikörper, die erfindungsgemäß verwendet werden können, können mittels dem Fachmann gut bekannten Standardtechniken de novo hergestellt werden. Beispiele von Antikörpern, die in der Erfindung verwendet werden können, schließen alle Antikörper gegen HLA-Antigene, die in dem "Catalogue of Cell Lines and Hybridomas" des ATCC (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852) erwähnt sind, mit ein, ohne sich jedoch darauf zu beschränken. Bevorzugte Beispiele (in der ATCC-Nomenklatur) schließen HB82, 117, 166, 54, 122, 164, 95, 120, 116, 118, 94, 152, 178, 56, 115, 157, 119, 59, 105, 165, 144, 180, 103, 110, 109, 151 und 104 mit ein. Alle in dem Katalog erwähnten Antikörper gegen Maus-H-2-Antigene können ebenso in der Erfindung verwendet werden. Besonders bevorzugt erfolgt die Immunpräzipitation durch Festphasen-gebundene Antikörper. Festphasen-

gebundene Antikörper lassen sich auf eine dem Fachmann bekannte Weise herstellen, z.B. durch Kopplung des Antikörpers an Bromcyan-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia LKB). Andere Beispiele von Festphasen, an die Antikörper zur erfindungsgemäßen Verwendung gebunden werden können, schließen Agarose, Cellulose, Sephadex, Protein-A-Sepharose und Protein-G-Sepharose mit ein, ohne sich darauf zu beschränken. Das bevorzugte Verfahren der Immunpräzipitation stellt Adsorptions-chromatographie mittels Antikörper, die an aus Cyanogenbromid-aktivierter Sepharose 4B (siehe Beispiel 1) hergestellten Kügelchen gekuppelt sind, dar.

Die Abtrennung der zu bestimmenden Peptidmischungen von MHC-Molekülen und sonstigen Proteinbestandteilen erfolgt günstigerweise durch ein chromatographisches Verfahren, vorzugsweise über Reversed Phase-HPLC. Dabei hat es sich als günstig erwiesen, daß die Abtrennung in einem Trifluoressigsäure/H₂O-Trifluoressigsäure/Acetonitril-Gradienten erfolgt. Andere Verfahren, die erfindungsgemäß zur Abtrennung von Peptidmischungen von MHC-Molekülen verwendet werden können, schließen Ionenaustausch, Gelfiltration, Elektrofokussierung, High Performance Capillar Elektrophorese (HPCE) und Gelelektrophorese mit ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Ein anderes Mittel zur Durchführung der Trennung stellt Ultrafiltration dar, wobei eine Membran mit einer Permeabilität von 3000 oder 5000 oder 10000 Da verwendet wird. Bevorzugt wird die Trennung mittels HPLC durchgeführt.

Bei der chromatographischen Auftrennung der Peptidgemische kann man in manchen Fällen eine einzige Peptidspezies isolieren. Somit besteht Schritt (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens entweder in der Sequenzierung eines Peptidgemisches, wodurch eine Konsensussequenz für die auf dem jeweiligen MHC-Molekül befindlichen Peptidmotive bestimmt werden kann, oder/und in der Sequenzierung eines definierten Peptids.

Als Ausgangsmaterial für die Bestimmung von Peptidmotiven können normale Zellen, Tumorzellen, als auch durch Viren oder sonstige Erreger infizierte Zellen sowie in vitro kultivierte Zellen des Menschen oder von Tieren verwendet werden. Normale Zellen, die in der Erfindung verwendet werden können, schließen frische Zellen, wie z.B. periphere Blutlymphozyten, Zellen der Milz, der Lunge, des Thymus oder Zellen von einem anderen Gewebe, das MHC-Moleküle exprimiert mit ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt. In der Erfindung verwendete Tumorzelllinien schließen die Tumorzellen EL4 und P815 mit ein, sind jedoch ebenfalls nicht darauf beschränkt. Virusinfizierte Zellen, die in der Erfindung verwendet werden können, schließen, ohne darauf beschränkt zu sein, JY-Zellen, die durch den Epstein-Barr-Virus transformierte menschliche B-Zellen sind, mit ein. Die durch das erfindungsgemäße Verfahren bestimmten Peptidmotive entsprechen dem folgenden Grundprinzip:

- a) Sie weisen eine allelspezifische Peptidlänge von 8, 9, 10 oder 11 Aminosäuren bei MHC-Klasse I-Molekülen sowie von 8 bis 15 Aminosäuren bei MHC-Klasse II Molekülen auf,
- b) sie besitzen zwei Ankerpositionen (die Bezeichnung "Ankerposition" wird verwendet, wenn eine Position ein starkes Signal für einen einzigen Aminosäurerest zeigt oder wenn eine Position durch einige wenige Aminosäurereste mit sehr nahe verwandten Seitenketten besetzt wird), wovon sich eine Ankerposition immer am C-terminalen Ende befindet und häufig aliphatisch ist, und
- c) die Peptide werden natürlicherweise auf MHC-Molekülen von normalen, virusinfizierten, anderweitig infizierten

oder mit Genen transfizierten oder mit Antigen beladenen Zellen präsentiert.

Die Sequenzierung der Selbstpeptidgemische aus den MHC-Klasse I-Molekülen H2K^d, H2K^b, H2D^b und HLA-A2 zeigt ein jeweils unterschiedliches allelspezifisches Peptidmotiv, das von jedem der Klasse I-Moleküle präsentiert wird. Die von K^d, D^b und A2 präsentierten Peptide sind Nonamere, während die K^b-präsentierten Peptide Octamere sind, wobei die korrespondierenden Peptidmotive zwei Ankerpositionen enthalten, die durch einen einzigen Aminosäurerest oder durch einen aus einer geringen Anzahl von Aminosäureresten mit nahe verwandten Seitenketten besetzt sind. Diese Ankerpositionen befinden sich bei den unterschiedlichen Motiven nicht an derselben Stelle, sie können etwa an Position 5 und 9 (D^b) oder 2 und 8 (K^d, A2) oder 5 und 8 (K^b) sein. Die C-terminalen Ankerreste aller Motive sind hydrophobe Aminosäuren. Die nicht an Ankerpositionen befindlichen Aminosäurereste können ziemlich variabel sein, einige jedoch werden vorzugsweise durch bestimmte Aminosäuren besetzt, beispielsweise findet man häufig Pro an Position 4 des K^d-Motivs, Tyr an Position 3 des K^b-Motivs und hydrophobe Reste herrschen an den Positionen 3 des D^b-Motivs und 6 des A2 Motivs vor. Für H-2L^d war ein Ankerrest Prolin an Position 2.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren gewonnenen Ergebnisse entsprechen sehr gut der Struktur des kristallographisch gefundenen Spalts bei MHC-Klasse I-Molekülen (3,6). Unterschiedliche MHC-Klasse I-Allele unterscheiden sich an diesem Spalt durch das Vorhandensein unterschiedlicher Taschen, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß die Taschen jeweils unterschiedliche Aminosäuren aufnehmen können. Daher stellen die allelspezifischen Taschen in den MHC-Kristallen und die Seitenketten der allelspezifischen Ankerreste vermutlich komplementäre Strukturen dar.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Peptidmotive bei einem Verfahren zur Herstellung eines diagnostischen oder therapeutischen Mittels. Ein mögliches Anwendungsgebiet der Peptidmotive ist der diagnostische Nachweis von MHC-Molekülen. Da die MHC-Moleküle durch ihre individuelle spezifische Bindung von Peptiden charakterisiert sind, kann ein Bindungsnachweis über Peptide einer Markierungsgruppe erfolgen, wobei als Markierungsgruppe beispielsweise eine Biotin- oder eine Fluoreszenzgruppe an das Peptid gekoppelt wird. Andere dem Fachmann bekannte Markierungen können ebenso in der Erfindung verwendet werden. Diese Markierungen schließen, ohne sich darauf zu beschränken, radioaktive Markierungen wie z.B. an Thyrosinreste von Peptiden gebundenes ^{131}I oder ^{125}I , oder ^3H oder ^{14}C (beide während deren Synthese in die Peptide eingebaut) mit ein. Bindung der Markierungen an die Peptide kann nach dem Fachmann gut bekannten Verfahren erreicht werden. Die Markierung erfolgt vorzugsweise an Nicht-Ankerpositionen. Die auf solche Weise gefundenen Korrelationen zwischen dem Auftreten von Autoimmunkrankheiten und der Expression von MHC-Molekülen mit krankheitsspezifischen Peptidmotiven können diagnostisch verwertet werden. Beispiele von in vitro diagnostischen Verwendungen der erfindungsgemäßen Peptidsequenzen schließen, ohne sich darauf zu beschränken, Messung der Bindungsspezifität von MHC-Molekülen, Korrelierung der Bindungsspezifität von MHC-Molekülen mit Krankheiten, und Bestimmung der Sequenz von T-Zellepitopen unbekannten Ursprungs durch Inkubieren geeigneter Zellen, die die interessierenden MHC-Moleküle exprimieren mit HPLC-Fraktionen einer Peptid-Bank (Mischung von Peptiden, die in das untersuchte Motiv passen) und Bestimmung der durch die T-Zelle erkannten Peptide, gefolgt von chromatographischem Vergleich des natürlichen T-Zellepitops mit dem als T-Zellepitop erkannten synthetischen Peptid (Nature 348: 252-254 (1990)) mit ein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Peptidmotive bei einem Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie von Störungen des Immunsystems oder von Tumorerkrankungen. Insbesondere können die erfindungsgemäßen Peptidmotive für die Intervention bei Autoimmunkrankheiten (Prophylaxe und Therapie), beispielsweise durch Blockierung bestimmter MHC-Moleküle sowie durch die Induktion peptidspezifischer Nicht-Reaktivität von T-Zellen, verwendet werden. Weiterhin ist eine Intervention bei Transplantatabstoßungen und Graft-versus-Host-Reaktionen auf analoge Weise möglich. Ferner können die erfindungsgemäßen Peptide für die Induktion oder die Verstärkung bzw. Vermehrung von gegen Tumorzellen gerichteten T-Zellen in vitro und in vivo eingesetzt werden, insbesondere für die Vakzinierung gegen Tumorerkrankungen und für die Therapie bestehender Tumorerkrankungen, wobei insbesondere der sogenannte Graft-versus-Leukämia-Effekt (Sullivan et al., N.Engl.J.Med. 320: 828-834) ausgenutzt werden kann. Die erfindungsgemäßen Peptide können ebenso dazu verwendet werden, T-Zellantworten gegen infektiöse oder maligne Krankheiten zu verstärken, indem MHC-bindende Peptide, die spezifisch für das infektiöse Mittel oder für Tumore sind, in vivo eingesetzt werden. Alternativ können T-Zellen aus Patienten gewonnen werden, ihre Anzahl in vitro durch Verwendung von Peptiden und geeigneten Wachstumsbedingungen, einschließlich Cytokine, wie z.B. Interleukin 2, Interleukin 4 oder Interleukin 6 vermehrt und anschließend in den Patienten zurückgeführt werden. Die erfindungsgemäßen Peptide können weiterhin dazu verwendet werden, alle Tumore, die durch T-Zellen angreifbare Antigene exprimieren, einschließlich, ohne darauf zu beschränken, Melanome, Brustkrebs, Tumore viralen Ursprungs, wie z.B. Burkittslymphom und solche Tumore, die durch menschlichen Papillomavirus wie zervikales Karzinom und andere anogenitale Tumore zu behandeln. Peptide, die von T-Zellrezeptor-Molekülen oder Antikörper-

per molekülen abstammen, können auch für die gezielte Manipulation immunregulatorischer Mechanismen eingesetzt werden, insbesondere für die Bekämpfung von Autoimmunkrankheiten und Transplantatabstoßungen, sowie Graft-versus-Host-Reaktionen. In vivo-Verwendungen der erfindungsgemäßen Proteine zur Prävention schließen ihre Verwendung, ohne darauf beschränkt zu sein, als Peptidvakzine gegen infektiöse oder maligne Krankheiten und Verwendung der in dieser Erfindung gesammelten Information bezüglich geeigneter T-Zellepitope zu ihrem Einbau in alle anderen Arten von Impfstoffen einschließlich rekombinante Impfstoffe (einschließlich Viruse wie Vaccinia oder Bakterien wie Salmonella oder Mycobacteria) und Proteine, die durch Verwendung von rekombinanten Bakterien (z.B. E.coli) oder anderen Zellen, einschließlich Hefe-, Insekten-, Maus- oder menschlichen Zellen hergestellt wurden, mit ein.

Die Dosierung oder Konzentrationen der erfindungsgemäße Peptide können durch den Fachmann routinemäßig bestimmt werden. Diese können in vivo in einem Bereich von 10 µg bis 1 g erwartet werden. In vitro-Konzentrationen können in einem Bereich von 1 Femtomol bis 1 Micromol erwartet werden. Die Verabreichung in vivo schließt, ohne sich darauf zu beschränken, einen subkutanen, intramuskulären, intravenösen, intradermalen und oralen Weg mit ein.

Vorzugsweise ist bei der therapeutischen Verwendung ein Peptid, das einem erfindungsgemäßen Peptidmotiv entspricht, N-oder/und C-terminal mit lipophilen bzw. amphiphilen Gruppen, insbesondere lipophilen Peptid-Helices kovalent verknüpft. Ein Beispiel für eine derartige Gruppe ist Tripalmitoyl-S-glycerylcysteiny-l-serylserin.

Die Erfindung soll weiter durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den Figuren 1 und 2 veranschaulicht werden.

Es zeigen

Fig. 1a ein HPLC-Profil von Material, das mit Anti-K^d-Antikörpern aus P815 Lyssat abgetrennt wurde,

Fig. 1b einen vergrößerten Ausschnitt des Chromatogramms aus 1a (Fraktionen 15 - 35),

Fig. 1c eine Rechromatographie des in 1b mit einem Pfeil gekennzeichneten Selbstpeptids,

Fig. 2 MHC-Moleküle und ihre Liganden.

Beispiel 1

10 bis 20x10⁹ P815-Tumorzellen (H-2K^d) wurden pelletiert und 30 Minuten mit 250 ml 0,5 % Nonidet P40 in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) mit 0,1 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) bei 4°C gerührt. Der Überstand wurde 5 Minuten bei 250 g und 30 Minuten bei 150.000 g und 4°C zentrifugiert und dann durch eine adsorptionschromatographische Anordnung geleitet. Die adsorptionschromatographische Anordnung bestand aus drei Säulen mit jeweils einem Bettvolumen von etwa 1 ml. Das Säulenmaterial bestand aus Antikörper-gekoppelten bzw. Glycin-gekoppelten Kügelchen, die aus Bromcyan-aktivierter Sepharose 4B (Pharmacia LKB) gemäß dem Protokoll des Herstellers hergestellt wurden. Als Antikörper wurden jeweils 5 mg von K^d-spezifischem Antikörper 20-8-4S (IgG 2a, kappa; 25) oder D^b-spezifische Antikörper B22-249 (IgG 2a, kappa; 26) an 1 ml der Kügelchen gekoppelt. Der Überstand des Zellextrakts wurde zunächst durch eine Säule mit Glycin-gekoppelten Kügelchen, dann durch eine entsprechende Säule mit Anti-K^d-Kügelchen und dann für eine Scheinpräzipitation über Anti-D^b-Kügelchen geleitet.

Die Kügelchen wurden aus allen drei Säulen entfernt und mit 0,1 % Trifluoressigsäure für 15 Minuten verwirbelt (7). Die Überstände wurden durch Vakuumzentrifugation getrocknet und

- 11 -

durch Reverse Phase HPLC unter Verwendung einer Superpac Pep S Säule (C2/C18; 5 μ m Teilchen, 4,0 x 250 mm, Pharmacia LKB) und einer Pharmacia LKB-Apparatur abgetrennt (4). Elutionsmittel: Lösung A 0,1 % Trifluoressigsäure in H₂O (v/v), Lösung B 0,1 % Trifluoressigsäure in Acetonitril.

Für die in Figur 1a und b gezeigten chromatographischen Trennungen wurde der folgende Gradient verwendet:

0 bis 5 Minuten, 100 % A

5 bis 40 Minuten linearer Anstieg auf 60 % B,

40 bis 45 Minuten 60 % B,

45 bis 50 Minuten Abnahme auf 0 % B,

Flußrate: 1 ml/Minute, Fraktionsgröße: 1 ml.

Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und durch Vakuum-zentrifugation getrocknet.

Figur 1 zeigt die HPLC-Auftrennung von immunpräzipitierten und Trifluoressigsäure-behandelten K^d-Molekülen. Figur 1a zeigt ein HPLC-Profil von TFA-behandeltem Material, das aus P815-Lysat mit Anti-K^d (durchgehende Linie) bzw. mit Anti-D^b (gestrichelte Linie) präzipitiert wurde. Zwischen den Fraktionen 20 und 28 wird heterogenes Material in geringen Mengen eluiert, bei dem es sich um die gesuchten allelspezifischen Peptidgemische handelt.

Die Fraktionen 20 bis 28 wurden sowohl aus dem K^d-Ansatz als auch von dem Scheinpräzipitat gesammelt. Beide Ansätze wurden unter Verwendung der Edman-Abbaumethode automatisch sequenziert (Edman et al., Eur.J.Biochem. 1: 80-91 (1967)). Der Edman-Abbau wurde in einem Protein Sequencer 477A, ausgestattet mit einem on-line PTH-Aminosäure Analysator 120A (Applied Biosystems, Foster City, CA, 94404, USA) durchgeführt. Glasfaserfilter wurden mit 1 mg BioPrene Plus beschichtet und nicht präzyklisiert. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung

der Standardprogramme BEGIN-1 und NORMAL-1 (Applied Biosystems) durchgeführt. Cystein wurde nicht modifiziert und konnte deshalb auch nicht nachgewiesen werden.

Das Edman-Verfahren beinhaltet eine sequenzielle Derivatisierung und Aminosäurenentfernung vom N-Terminus, von denen jede chromatographisch identifiziert wird. Da es ungewöhnlich ist, komplexe Gemische von Peptiden zu sequenzieren, werden die direkt aus dem Sequenziergerät gewonnenen Daten präsentiert. Tabelle 1a und b zeigen die Ergebnisse aus zwei Sequenzierungsversuchen für K^d-eluierte Peptide. Tabelle 1c zeigt das Sequenzierungsergebnis einer Scheinelution mit D^b-spezifischen Antikörpern auf P815-Lysaten. Die K^d-eluierten Peptide haben ein klares Aminosäuremuster für jede Position von 1 bis 9, während das scheineluierte Material durchgehend ein gleichförmiges Aminosäuremuster mit einer Abnahme der absoluten Menge jedes Rests bei jedem Zyklus zeigt. Bei den K^d-eluierten Peptiden wurden nur die Reste, die mehr als 50 % Anstieg in der absoluten Menge im Vergleich mit dem vorherigen oder dem vorvorherigen Zyklus zeigten, als signifikant erachtet und unterstrichen. Die erste Position ist schwierig zu beurteilen, da es keinen vorherigen Zyklus gibt und überdies alle im HPLC-Pool vorhandenen freien Aminosäuren an dieser Position nachgewiesen werden. Für die zweite Position ist der einzige Rest, dessen Häufigkeit im Vergleich zum vorherigen Zyklus klar erhöht ist, Tyrosin (z.B. Tabelle 1a 60,9 pmol auf 875,6 pmol). Der einzige andere Rest, der einen (geringen) Anstieg zeigt, ist Phenylalanin, das eine zu Tyr ähnliche Seitenkette aufweist. Dies bestätigt die Annahme, die aus einem Vergleich des natürlichen K^d-restringierten Influenza-Epitops (mit der Sequenz TYQTRALV) mit anderen K^d-restringierten Peptiden im Hinblick auf den Tyrosin-Rest an Position 2 resultiert. Dagegen gibt es keinen definierten Aminosäurerest, der für die folgenden Positionen 3 bis 8 charakteristisch ist. Es werden bis zu 14 unterschiedliche

Reste in den einzelnen Positionen gefunden. An Position 9 werden Ile und Leu gefunden. Es gibt keinen Signalanstieg an Position 10, was darauf hindeutet, daß die meisten K^d-gebundenen Selbstpeptide nicht länger als 9 Reste sind. Das natürliche K^d-restringierte Influenza-Peptid ist somit ein Nonapeptid (4). Das Konsensussequenzmuster, das aus diesen Ergebnissen hervorgeht, ist in Tabelle 1c gezeigt. Am meisten auffallend sind Tyr an Position 2 und Ile oder Leu an 9, während an allen anderen Positionen eine größere Anzahl an Resten gefunden wird. Ein Vergleich dieses Motivs mit Peptidsequenzen, die K^d-restringierte Epitope enthalten, zeigt, daß die meisten gut zu dem K^d-restringierten Konsensusmonomer-Motiv passen (Tabelle 1d).

Der durch einen Pfeil in Fraktion 29 von Figur 1b markierte Peak und die korrespondierende Fraktion der Scheinpräzipitation wurden unter höherer Auflösung erneut chromatographiert, wobei das Fraktionsvolumen 0,5 ml betrug (Fig. 1c). Der scharfe spezifische Peak stellte ein Peptid mit der Aminosäuresequenz SYFPEITHI dar, das durch direkte Sequenzierung bestimmt wurde. Die Identität dieses natürlichen Zellpeptids mit synthetischem SYFPEITHI-Peptid wurde durch Coelution auf HPLC bestätigt (Fig. 1c). Die Sequenz paßt zu dem Konsensusmotiv aus dem Pool der Fraktionen 20 bis 28 (Fig. 1a,b), wodurch das Vorhandensein eines spezifischen K^d-restringierten Peptidmotivs (Tabelle 1d) bestätigt wird.

Tabelle 1

Sequenzierung des Selbstpeptidgemisches, das aus Immunpräzipitierten K^d-Molekülen eluiert wurde

(a) Experiment 1		Aminosäurereste													(n pmol)			
Zyklus	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
1	172.0	46.1	44.9	13.6	72.5	317.0	171.6	3.2	73.1	66.5	231.2	20.0	35.3	56.7	145.2	73.3	60.9	130.9
2	25.6	14.1	10.1	7.7	10.7	71.9	71.9	1.2	20.4	22.6	13.9	11.1	91.7	14.0	14.6	9.3	875.6	10.0
3	90.7	26.7	51.5	10.0	23.1	86.8	62.5	2.9	103.2	208.7	71.6	25.6	41.5	13.5	24.0	22.0	66.1	150.2
4	150.5	14.2	31.9	17.9	52.3	44.8	85.2	6.7	32.1	36.0	29.5	9.2	5.0	226.9	26.2	19.9	14.7	41.5
5	139.0	30.1	42.2	22.9	15.1	44.1	154.5	1.0	59.3	86.6	10.2	50.8	2.6	87.8	64.2	47.6	8.8	104.2
6	116.5	29.2	42.6	13.0	10.6	39.3	139.1	0.5	90.1	99.9	194.5	69.7	21.5	33.0	15.1	26.5	35.9	106.8
7	51.5	79.7	125.1	25.8	47.0	73.7	65.0	7.9	12.8	23.4	37.8	11.2	5.1	16.9	39.3	148.4	11.2	36.1
8	44.2	29.0	48.9	22.4	75.8	58.0	59.0	10.3	10.1	30.4	41.5	10.5	19.3	10.8	28.8	46.0	47.9	63.2
9	13.0	8.3	20.1	10.7	14.4	10.4	20.5	3.5	129.4	155.2	3.9	4.9	5.0	7.2	7.0	10.1	9.4	35.4
10	6.5	4.4	7.8	6.1	4.2	5.6	14.6	1.3	32.1	59.3	3.1	1.0	3.1	4.7	4.2	5.2	4.3	8.8

(b) Experiment 2

Zyklus	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
1	54.5	0.4	5.0	3.5	5.0	5.0	62.5	1.8	11.2	13.2	35.3	5.8	11.5	35.3	57.8	26.0	15.1	29.2
2	14.1	0.2	1.2	1.0	2.2	3.6	20.0	0.5	3.4	5.7	3.4	1.6	19.6	8.6	8.5	5.1	187.7	5.5
3	22.4	4.4	10.2	2.5	7.1	15.2	26.2	0.8	41.0	72.2	12.7	7.5	23.0	6.6	6.7	5.3	16.9	22.7
4	40.2	1.4	11.7	5.5	13.8	8.1	34.3	2.3	7.3	10.4	4.9	3.7	2.1	60.0	6.9	5.7	3.8	12.1
5	35.2	1.7	11.7	0.0	9.1	7.2	41.5	0.7	12.3	10.1	1.4	17.0	0.9	20.7	16.1	11.6	1.7	25.6
6	32.3	5.4	7.9	5.0	6.4	6.5	35.9	1.0	32.4	31.2	31.4	19.2	4.3	0.4	4.2	3.5	5.5	27.0
7	11.2	1.1	21.7	11.8	17.2	15.7	16.0	2.2	5.7	7.0	5.9	2.9	1.1	1.5	12.4	47.2	2.0	9.0
8	10.7	2.4	7.0	7.3	16.5	9.7	19.5	4.3	2.5	0.7	5.0	2.4	4.2	0.8	7.6	10.7	0.2	10.8
9	4.1	2.6	4.0	4.2	4.8	1.9	10.6	0.4	21.0	20.6	0.0	1.3	1.5	0.5	2.3	3.1	1.8	7.7
10	2.5	1.0	1.3	3.1	2.7	1.0	7.5	0.2	13.0	13.5	0.0	1.0	1.3	1.5	1.6	1.4	1.2	3.4

(c) Sequenzierung des schnellpräzipitierten Materials

Zyklus	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
1	63.5	5.6	3.6	3.9	0.3	11.3	51.5	2.3	12.2	16.5	8.4	3.5	10.8	47.0	35.2	27.3	12.7	24.4
2	24.0	2.5	3.1	3.6	7.9	6.2	33.0	1.3	6.9	12.1	4.5	1.4	5.8	18.4	7.4	6.4	6.9	13.8
3	15.2	0.9	2.5	3.0	0.6	3.6	26.6	1.2	4.1	11.0	2.7	1.2	4.2	10.1	2.7	4.0	4.3	8.6
4	11.5	1.0	2.2	3.2	5.7	2.6	19.5	0.8	3.9	7.3	2.8	1.1	2.7	10.7	1.6	2.4	3.1	6.4
5	10.5	1.4	2.1	3.1	5.0	2.0	15.7	1.0	3.1	6.2	2.3	0.7	2.2	7.9	0.9	1.7	2.6	5.2
6	8.0	1.1	1.6	3.1	4.1	2.0	12.6	1.1	2.2	4.6	1.9	0.6	1.9	6.5	1.1	1.4	1.9	3.9
7	6.8	1.0	1.6	2.4	3.5	1.0	9.8	0.5	1.8	3.4	2.1	0.4	1.7	4.3	1.6	1.5	1.7	2.7
8	0.0	0.3	0.0	2.1	0.2	0.8	0.8	0.6	1.1	2.8	1.7	0.3	1.1	3.6	0.9	2.2	0.7	2.6
9	0.1	0.6	0.0	1.0	0.0	0.8	0.7	0.2	1.6	2.5	1.7	0.5	1.1	3.3	1.3	1.7	0.1	2.1
10	0.2	0.3	0.0	1.7	0.1	0.5	0.8	0.2	1.0	2.5	1.4	0.3	1.3	2.7	0.8	1.7	0.1	2.1

Tabelle 1d

Das K^d-restringierte Peptidmotiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dominante Ankerreste		Y							I L
stark			N	P	M	K	T		
			I			F	N		
			L						
schwach	K	F	A	A	V	H	P	H	
	A		H	E	N	I	H	E	
	R		V	S	D	M	D	K	
	S		R	D	I	Y	E	V	
	V		S	H	L	V	Q	V	
	T		F	N	S	R	S	F	
			E		T	L		R	
			Q		G				
			K						
			M						
			T						

Bekannte Epitope*

T Y Q R T R A L V
S Y F P E I T H I
 I Y A T V A G S L
 V Y Q I L A I Y A
 I Y S T V A S S L
 L Y Q N V G T Y V
 R Y L E N G K E T L
 R Y L K N G K E T L
 K Y Q A V T T T L
 S Y I P S A E K I
 S Y V P S A E Q I

Proteinquelle

Influenza PR8 NP 147-154

Selbstpeptid P815

Influenza JAP HA 523-549

Influenza JAP HA 523-549

Influenza PR8 HA 518-528

Influenza JAP HA 202-221

HLA-A24 170-18233

HLA-Cw3 170-186

P815 Tumor-Antigen

Plasmodium berghei CSP 249-260

Plasmodium yoeli CSP 276-288

Literatur-

stelle

4,29

30,31

30,31

32

30,31

33

34

35

36

37

* Peptide, von denen bekannt ist, daß sie K^d-restringierte T-Zellepitope enthalten, wurden gemäß ihrer Tyr-Reste in Übereinstimmung gebracht. Peptide, von denen bekannt ist, daß sie natürlich prozessiert sind, sind unterstrichen.

Beispiel 2

Elution von Peptiden aus K^b- und D^b-Molekülen

Detergenz-Lysate aus EL4-Tumorzellen (E-2^b) wurden mit K^b-spezifischen und D^b-spezifischen Antikörpern, wie in Beispiel 1 beschrieben, immunpräzipitiert. Als D^b-Antikörper wurde B22-249 (siehe Beispiel 1) und als K^b-Antikörper wurde K9-178 (IgG 2a, K, 27) verwendet. Die von MHC-Molekülen dissoziierten Peptide wurden durch Reverse Phase HPLC aufgetrennt. Sowohl K^b- als auch D^b-Material wurde mit Profilen eluiert, die in etwa dem K^d-Material aus Beispiel 1 entsprachen, wobei jedoch in dem heterogenen Material, das zwischen Fraktionen 20 und 28 eluierte, gewisse Unterschiede auftraten.

D^b-restringiertes Peptidmotiv

Die vereinigten Fraktionen 20 bis 28 aus dem D^b-Ansatz wurden sequenziert (Tabelle 2a,b). Die Positionen 2 bis 4 enthielten mehrere Reste. Dagegen gab Zyklus 5 ein starkes Signal für Asn. Der vorherrschende Rest an Position 5 der D^b-eluierten Selbstpeptide ist somit Asn. Das schwache Signal für Asp wird durch Hydrolyse von Asn zu Asp unter den Sequenzierungsbedingungen verursacht. Die Positionen 6 bis 8 enthielten 5 bis 14 unterschiedliche nachweisbare Reste. Position 9 enthielt ein starkes Signal für Met, ein mittleres für Ile und ein schwaches für Leu (alle hydrophob). (Die Bedeutung von Met oder Ile in einem D^b-restringierten Epitop wurde bereits berichtet, siehe 17). An Position 10 war kein Signal, was darauf hindeutet, daß D^b-präsentierte Selbstpeptide Nonapeptide sind. Das durch diese Ergebnisse ermittelte Konsensusmotiv ist in Tabelle 2c g zeigt. Ein Vergleich dieses Motivs mit

- 17 -

dem natürlichen D^b-restringierten Peptid und mit anderen Peptiden, die D^b-restringierte Epitope enthalten, zeigt, daß Asn an Position 5 ein unveränderlicher Ankerrest des D^b-restringierten Peptidmotivs sein kann. Die anderen Reste der D^b-restringierten Epitope unterscheiden sich erheblich, mit Ausnahme von Position 9 (mit Met, Ile oder Leu), die wie eine zweite Ankerposition aussieht.

Tabelle 2

(a) Experiment 1		Amino acids										(in pmol)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	Ala	Val	Leu	Ile	Met	Pro	Gly	His	Arg	Asp	Glu	Thr	Ser	Tyr	Trp	Phe	Ala	Val	Leu	Ile	Met	Pro	Gly	His	Arg	Asp	Glu	Thr	Ser	Tyr	Trp																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
1	257.2	10.2	21.6	21.6	7.1	8.4	32.6	1.3	18.0	20.3	21.2	2.3	22.0	7.7	33.0	27.5	124.6	43.9	26.9	70.1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
2	202.1	7.2	5.4	5.4	6.0	7.4	24.7	116.2	0.9	5.4	9.9	6.5	154.1	8.2	4.3	8.2	52.7	15.0	5.5	16.0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
3	29.9	5.9	5.3	5.3	0.0	3.0	5.5	185.1	1.1	106.3	65.8	0.0	8.3	8.3	3.8	88.1	8.3	4.7	5.2	22.2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
4	10.3	0.1	4.2	4.2	4.6	32.4	21.0	49.3	0.8	32.7	21.5	12.4	3.6	2.3	2.3	20.0	9.9	10.6	5.0	165.2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
5	6.8	2.1	221.4	26.0	8.2	8.2	4.3	43.0	0.6	4.7	6.2	2.5	1.3	0.9	11.7	4.5	5.0	1.7	7.6	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
6	42.1	5.9	29.6	7.1	8.4	32.6	1.3	18.0	20.3	21.2	2.3	22.0	7.7	33.0	27.5	124.6	43.9	26.9	70.1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
7	21.5	23.4	10.2	24.5	30.4	23.2	10.3	18.2	0.3	3.0	10.1	4.4	1.3	5.0	9.5	20.5	24.9	12.5	20.7	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
8	14.6	10.1	11.3	9.8	23.2	3.1	1.6	11.2	0.5	0.5	13.7	0.5	7.7	3.0	2.5	2.0	3.3	3.6	3.5	3.5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
9	7.5	3.2	7.9	3.2	3.1	1.9	1.2	12.5	0.3	4.2	8.5	0.4	2.7	1.8	2.1	1.6	1.7	1.9	1.3	1.3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
10	2.6	1.1	2.5	2.4	1.9	1.9	1.2	12.5	0.3	4.2	8.5	0.4	2.7	1.8	2.1	1.6	1.7	1.9	1.3	1.3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
(b) Experiment 2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	413.4	45.0	29.7	15.9	14.5	19.6	132.4	4.7	41.5	40.8	17.2	307.7	26.1	50.0	47.4	110.1	11.3	22.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.

Tabelle 2c

Das D^b-restringierte Peptidmotiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dominante Ankerreste					N				M
stark		M	I	K		L			I
			L	E		F			
			P	Q					
			V	V					
schwach	A	A	G	D		A	D	F	L
	N	Q		T		Y	E	H	
	I	D				T	Q	K	
	F					V	V	S	
	P					M	T	Y	
	S					E	Y		
	T					Q			
	V					H			
						I			
						K			
						P			
						S			

Bekannte Epitope

	Proteinquelle	Literatur- stelle
<u>A S N E N M E T M</u>	Influenza NP 366-374	154 4,2
S G P S N T P P E I	Adenovirus E1A	38
S G V E N P G G Y C L	Lymphozyten Choriomeningitis Virus GP 272-293	39
S A I N N Y . . .	Simian Virus 40 T 193-211	40

K^b-restringiertes Peptidmotiv

Die vereinigten Fraktionen 20 bis 28 aus dem K^b-Ansatz wurden sequenziert (Tabelle 3a,b). Position 3 enthielt ein starkes Signal für Tyr und ein schwaches für Pro. Position 4 zeigte schwache Signale für 5 Reste. Starke Signale für Phe und für Tyr machen diese beiden Reste an Position 5 vorherrschend. Die nächsten beiden Positionen enthielten 5 bzw. 3 Signale. Position 8 zeigte ein starkes Signal für Leu, ein mittleres für Met und schwächere für Ile und Val. Position 9 zeigte keinen Anstieg für irgendeinen Rest, was mit der Länge des bekannten K^b-restringierten natürlichen Peptids, das ein Octamer ist (5), übereinstimmt. Eine Analyse des K^b-restringierten Konsensusmotivs und Vergleich mit Epitopen zeigt zwei Ankerpositionen: Tyr oder Phe (beide mit ähnlichen aromatischen Seitenketten) an Position 5 und Leu, Met, Ile oder Val (alle mit ähnlichen hydrophoben Seitenketten) an Position 8.

Sequenzierung des aus K^b-molekülen erhaltenen Selbstpeptidogenisches

(A) Experiment 1		Amino Acids (in mmol)																	Total	
Sample	Ala	Arg	Asn	Asp	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val			
1	978.7	26.3	49.2	55.8	39.0	23.1	514.9	167.5	167.2	109.0	50.3	116.7	110.2	170.8	365.2	136.0	352.5			
2	345.5	3.9	37.3	41.8	23.5	20.3	475.2	44.5	43.1	72.6	12.6	25.4	51.0	253.1	80.5	50.1	93.5			
3	179.0	1.4	14.7	37.0	17.7	9.0	350.0	5.9	19.0	26.9	4.1	6.0	32.5	56.2	70.0	75.6	25.9			
4	52.1	3.5	10.8	45.3	30.0	9.2	246.7	5.0	7.0	17.7	2.4	3.0	14.6	22.0	13.4	12.0	16.4			
5	10.9	1.3	5.5	34.7	12.0	3.6	120.2	2.8	4.7	3.8	1.0	50.5	6.7	8.9	4.6	22.2	4.9			
6	16.2	0.8	5.6	32.7	12.0	3.7	77.9	2.4	3.5	3.9	0.9	4.5	7.3	9.2	18.3	7.3	6.2			
7	9.9	0.9	14.9	30.4	9.5	6.6	51.3	0.6	3.4	9.2	0.5	1.9	4.7	6.1	10.7	3.5	3.4			
8	6.0	1.4	5.1	22.7	6.0	3.3	29.2	0.8	1.4	1.8	2.1	1.0	3.8	4.1	3.1	2.5	3.6			
9	4.6	1.5	2.6	19.9	4.5	2.3	21.1	0.9	6.9	1.0	1.5	1.0	3.0	3.7	2.2	1.9	2.1			
10	3.9	0.5	1.9	17.5	3.7	2.1	17.5	1.0	4.0	0.8	0.9	1.2	2.0	3.5	1.0	2.0	1.5			
(b) Experiment 2																				
1	47.4	1.1	5.2	3.0	7.8	17.1	44.6	0.3	11.3	12.6	3.8	6.2	7.6	44.2	10.1	6.0	26.2			
2	24.0	0.2	9.4	2.8	5.1	8.0	42.5	0.5	4.7	6.3	1.3	3.7	3.5	14.9	10.3	3.1	6.9			
3	10.4	0.3	2.1	2.6	3.9	4.0	25.1	0.7	2.8	7.9	2.1	3.6	9.0	3.0	3.3	16.7	10.0			
4	9.6	1.3	2.7	5.7	7.5	4.1	24.5	0.7	1.5	5.0	6.2	1.5	5.9	3.0	5.9	2.1	4.5			
5	5.8	0.8	1.8	2.8	3.3	2.5	14.2	0.5	0.2	3.9	0.4	18.3	3.5	1.3	2.0	20.8	2.2			
6	0.6	0.2	2.3	2.7	6.3	2.7	9.2	0.0	1.0	2.4	0.4	2.3	3.2	2.7	5.2	3.6	2.4			
7	5.0	0.1	8.2	3.3	3.9	4.3	10.4	0.6	0.4	2.3	0.1	1.2	2.1	1.9	2.0	1.9	1.2			
8	4.0	0.1	3.1	2.0	2.6	1.7	6.9	0.2	0.2	1.6	1.0	0.8	1.1	0.7	1.3	1.1	2.2			
9	4.5	0.1	1.1	2.1	3.6	1.9	5.9	1.4	0.0	7.7	0.9	0.9	1.3	0.3	1.3	0.8	1.7			
10	3.9	1.7	0.3	4.5	3.0	1.4	5.4	0.2	0.0	3.9	0.6	0.6	1.1	0.6	1.1	0.8	1.1			

Tabelle 3c

Das K^b-restringierte Peptidmotiv

	Position							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Dominante Ankerreste					F			L
					Y			
stark			Y					M
schwach	R	N	P	R		T	N	I
	I			D		I	Q	V
	L			E		E	K	
	S			K		S		
	A			T				

Bekannte Epitope

	Proteinquelle	Literatur- stelle
<u>R G Y V Y O G L</u>	Vesicular Stomatitis Virus	
	NP 52-59	5
S I I N F E K L	Ovalbumin 258-276	41
A P G N Y P A L	Sendai Virus NP 321-332	42

Beispiel 3

HLA-A2.1-restringiertes Peptidmotiv

Ein Detergenz-Lysat von menschlichen JY-Zellen mit dem HLA-A2.1-MHC-Molekül (45) wurde mit A2-spezifischen Antikörpern (BB7.2, IgG2b, Literaturstelle 28) immunpräzipitiert. Die von A2-Molekülen dissoziierten Peptide wurden durch HPLC aufgetrennt. Es wurden die Fraktionen 20 bis 28 vereinigt und wie zuvor beschrieben sequenziert (Tabelle 4). Die zweite Position enthielt ein starkes Signal für Leu und ein mittleres für Met. An den Positionen 3 bis 5 wurden jeweils 6 bis 8

Reste gefunden. Position 6 enthielt Val, Leu, Ile und Thr. Die folgenden zwei Positionen zeigten jeweils 3 Signale. Position 9 zeigte ein starkes Val- und ein schwaches Leu-Signal. Position 10 zeigte keinen Anstieg für einen Rest, was darauf hinweist, daß A2-restringierte Epitope Nonapeptide sind. Leu oder Met an Position 2 und Val oder Leu an Position 9 scheinen die Ankerreste zu sein. Einige von bekannten Peptiden mit A2-restringierten Epitopen können mit dem Motiv in Übereinstimmung gebracht werden, während dies bei anderen nur teilweise möglich ist (Tabelle 4c). Die Existenz von mehreren Varianten von A2-Molekülen kann diese schlechte Übereinstimmung einiger Peptide mit dem Motiv verursachen.

Tabelle 4
Sequenzierung des Selbstpeptidogenisches, das aus A2.1-/Molekülen eluiert wurde

(a) Experiment 1		Aminosäurereste (mmol)														Y	
Zyklus	A	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Val	Val
1	172.6	0.0	31.9	25.7	44.0	125.9	112.4	2.0	144.4	60.0	30.7	63.3	117.9	75.9	49.0	50.3	104.9
2	47.5	0.0	16.2	14.1	25.6	53.1	44.7	1.6	69.6	15.5	71.0	10.5	30.7	16.2	16.1	12.2	86.5
3	99.0	0.0	9.5	10.3	12.3	20.4	31.0	11.1	51.5	5.0	55.7	19.4	30.4	12.0	0.7	20.9	46.0
4	36.0	0.6	12.7	26.4	59.5	21.7	56.2	1.3	10.4	22.7	5.2	5.2	52.4	10.9	14.0	5.2	20.0
5	35.1	0.1	13.4	10.6	20.1	19.0	55.6	2.0	21.4	23.9	4.1	6.2	39.1	7.5	10.5	11.6	29.0
6	30.3	0.0	16.0	14.1	21.4	17.3	20.5	1.4	60.1	14.7	4.4	5.0	40.0	0.2	20.3	5.0	106.2
7	47.1	0.0	11.7	9.5	27.2	21.0	19.0	3.2	36.3	7.9	5.7	0.0	54.1	5.4	13.6	14.0	62.0
8	31.9	0.3	13.4	0.1	22.3	24.3	21.1	1.0	11.6	23.0	3.4	5.1	22.3	8.0	17.9	10.7	22.4
9	23.3	0.0	5.1	6.0	15.7	10.5	14.0	0.7	11.5	8.7	3.1	2.7	11.9	5.6	6.7	5.1	60.2
10	12.0	0.7	2.6	4.4	6.5	5.2	10.2	0.4	4.5	4.5	1.0	1.0	7.1	2.7	3.2	2.3	20.4
(b) Experiment 2																	
1	110.0	10.0	4.0	3.1	10.0	14.5	55.7	0.2	60.3	44.4	10.0	0.2	20.3	27.4	14.0	19.0	40.0
2	13.4	1.6	2.0	1.9	6.8	11.0	9.0	0.0	37.9	202.7	0.0	26.2	6.3	4.4	4.5	3.3	26.5
3	62.4	3.5	5.0	0.1	4.9	10.0	12.6	0.1	35.7	71.5	0.0	24.5	13.4	0.2	4.0	12.2	19.6
4	16.0	2.7	4.5	0.9	25.3	7.9	24.5	0.1	6.2	10.3	2.0	1.3	22.1	4.9	5.0	1.8	9.3
5	22.3	1.6	6.0	0.6	14.3	9.9	31.0	0.0	16.6	15.1	0.2	1.9	16.3	4.5	4.6	5.7	10.3
6	10.6	1.3	6.6	3.6	6.4	6.2	10.1	0.1	30.7	27.1	0.0	1.4	12.6	3.2	6.1	1.3	39.2
7	19.2	1.0	4.7	2.5	7.2	9.0	5.6	0.2	22.3	16.1	0.0	1.9	17.4	1.0	3.5	7.6	27.2
8	13.4	1.2	3.1	1.3	7.9	6.3	6.9	0.3	4.7	6.7	0.6	2.0	5.1	2.2	4.9	1.6	5.3
9	5.7	0.5	0.9	0.8	2.9	2.0	2.7	0.2	3.0	11.5	0.4	0.3	2.0	1.0	1.1	0.4	10.0
10	2.9	0.6	0.5	0.5	1.0	0.9	1.8	0.3	1.6	5.1	0.4	0.3	0.8	0.4	0.3	0.2	3.6

Tabelle 4c

Das HLA-A2.1-restringierte Peptidmotiv (HLA-A*0201)

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dominante Ankerreste		L							V
stark		M		E		V		K	
				K					
schwach	I		A	G	I	I	A	E	L
	L		Y	P	K	L	Y	S	
	F		F	D	Y	T	H		
	K		P	T	N				
	M		M		G				
	Y		S		F				
	V		R		V		H		

Bekannte Epitope

	Proteinquelle	Literatur- stelle
I L K E P V H G V	HIV Reverse Transkriptase	
	461-485	43
G I L G F V F T L	Influenza Matrixprotein 57-68	44
I L G F V F T L T V	Influenza Matrixprotein 57-68	44
F L Q S R P E P T	HIV Gag Protein 446-460	46
A M Q M L K E . .	HIV Gag Protein 193-203	46
P I A P G Q M R E	HIV Gag Protein 219-233	46
Q M K D C T E R Q	HIV Gag Protein 418-443	46

Tabelle 5

Das HLA-A*0205-restringierte Peptidmotiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
a) A*0205									
Dominante Ankerreste									L
Andere									
		V	Y	G	V	I	Q	K	
		L	P	E	Y	V			
		I	F	D	L	T			
		Q	I	K	I	L			
		M		N		A			
						R			

Tabelle 6

Das H-2K^k-restringierte Peptidmotiv

	Position							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Dominante Ankerreste		E						I
Stark			K					
			N					
			Y					
			M					
Schwach	V		Q	L	A	N	T	
	F		I		G	K		
			L		P	H		
			F		T			
			P		V			
			H		F			
			T		S			

Tabelle 7

Das H-2K^b'-restringierte Peptidmotiv

	Position							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Dominante Ankerreste							I	
Stark			E	K				
Schwach			Q	N	P	A		R
			G	Q		R		Y
			P	G		K		
				M				
				P				
				Y				

Beispiel 4

Peptidmotive von HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11, HLA-A24, HLA-A31, HLA-A33, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B*2702, HLA-B*3501, HLA-B*3503, HLA-B37, HLA-B38, HLA-B*3901, HLA-B*3902, HLA-B*5101, HLA-B*5102, HLA-B*5103, HLA-B*5201, HLA-B58, HLA-B60, HLA-B61, HLA-B62, HLA-B78, HLA-Cw*0301, HLA-Cw*0401, HLA-Cw*0602, HLA-Cw*0702, HLA-Cw4, HLA-Cw6, HLA-Cw7, HLA-DRB1*0101, DRB1*1201, HLA-DR4w14, HLA-DR17, HLA-DRw52, HLA-DPw2, HLA-DPB1*0401, HLA-DQB1*0301, HLA-DQw1, HLA-DR1, HLA-DR3 und HLA-DR5

Die Bestimmung dieser Peptidmotive erfolgte entsprechend den Beispielen 1 bis 3. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8 bis 24 dargestellt.

Die Peptidmotive HLA-A, B und C sind MHC-Klasse I-Liganden. Die Peptidmotive HLA-DR, DQ und DP sind MHC-Klasse II-Liganden.

Bemerkungen zur Epitopvorhersage für HLA-Klasse I-Liganden

Anker: Alle Anker werden in der Regel bei allen natürlichen MHC-Klasse I-Liganden benutzt. Jedoch kommt es auch vor, daß andere als die angegebenen Ankerreste, nämlich solche mit ähnlichen Eigenschaften, benutzt werden (z.B. kann eine hydrophobe Aminosäure durch eine andere hydrophobe ersetzt werden). Die Zahl der Aminosäuren zwischen den Ankern ist in der Regel konstant, jedoch kommt es auch vor, daß ein oder zwei weitere Aminosäuren eingeschoben sind.

Hilfsanker: Diese werden bevorzugt, jedoch nicht obligatorisch, benutzt; sind mehrere Hilfsanker angegeben, wird in der Regel zumindest ein Teil davon benutzt.

Bei der Epitopvorhersage bezüglich einer Proteinsequenz wird man zweckmäßigerweise folgendermaßen vorgehen:

Die Proteinsequenz wird nach Ankerresten im richtigen Abstand abgesucht. Die so gefundenen Teilsequenzen (Liganden-Kandidaten) werden auf das Vorhandensein von Hilfsankerresten an der richtigen Position geprüft, was die Zahl der Ligandenkandidaten einengt. Aus den verbliebenen Kandidaten werden die ausgewählt, die noch weitere der bevorzugten Aminosäurereste enthalten.

Bemerkungen zur Epitopvorhersage für HLA-Klasse II-Liganden

Anker: Die HLA-Klasse II-Motive weisen 3 oder 4 Anker auf. Die einzelnen Liganden benutzen jedoch oft nur 2 dieser Anker. Vermutlich benutzen die besonders stark bindenden Liganden alle Anker, und vermutlich können fehlende Ankerreste durch Übereinstimmung in anderen bevorzugten Resten kompensiert werden.

Um dies zu verdeutlichen, sind bei den Ligandenbeispielen die passenden Ankerreste doppelt, die anderen bevorzugten Reste einfach unterstrichen.

Die allel-spezifischen Motive in den Tabellen 39 - 47 sind in relativen Positionen (Erster Anker = Relative Position 1) angegeben, da die Zahl der Aminosäurereste zwischen N-Terminus und erstem Anker bei Klasse II-Liganden variabel ist (im Gegensatz zu Klasse I-Liganden). In den Tabellen 48 - 50 sind die Motive in den absoluten Positionen angegeben.

Die Vorgehensweise bei der Epitop-Vorhersage innerhalb einer Proteinsequenz wird ähnlich sein wie bei Klasse I, nur daß von vornherein die Sequenz nach Übereinstimmung mit mindestens 2 Ankerresten (davon einer Anker 1) abgesucht wird. Werden auf diese Weise mehrere Ligandenkandidaten erhalten, werden zur weiteren Einengung die anderen bevorzugten Reste verglichen und schließlich auf Übereinstimmung mit dem (nicht allel-spezifischen) Prozessierungsmotiv (Protein aus absoluter Position 2 bzw. 12 bis 16) geprüft.

In der absoluten Position 2 der untersuchten HLA-Klasse II-Liganden findet sich ein sehr starkes Pro-Signal. Weitere Pro-Signale finden sich im Bereich des C-Terminus. Diese Pro-Signale scheinen ein bevorzugtes Merkmal von natürlichen Klasse II-Liganden zu sein. Das Prozessierungsmotiv für HLA-Klasse II-Liganden ist daher wie folgt:

absolute Position																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	P										P	P	P	P	P	

In den Tabellen 39 - 47 liegt der erste Anker im allgemeinen im Bereich der absoluten Positionen 3 - 5 oder 4 - 6.

Der obere Teil von Figur 2 zeigt einen vereinfachten Vergleich von Klasse II- und Klasse I-Liganden. Klasse II-Liganden (links) sind in der MHC-Spalte durch allel-spezifische Taschen verankert. Beide Enden der Spalte sind offen, d.h. die Liganden (12 - 25 Reste, durchschnittlich 15 - 16 Reste) können heraushängen. Der zweite Rest nach dem N-Terminus ist häufig Pro, vermutlich als Ergebnis einer Aminopeptidaseaktivität. Wie aus Figur 2 hervorgeht, ist dieser Pro-Rest nicht an der Bindung mit der MHC-Spalte beteiligt. D.h., ein synthetisches, MHC II-bindendes Peptidmotiv muß den Pro-Rest nicht enthalten, sondern es beginnt vorzugsweise erst mit dem ersten Ankerrest. Der Abstand zwischen den N-Termini und dem ersten Anker ist 5 ± 1 Reste für die Mehrzahl der Liganden. Der Abstand zwischen dem letzten Anker und dem C-Terminus ist nicht konstant. Die Hauptunterschiede zu Liganden der Klasse I (rechts) sind die feste Bindung der Peptidtermini innerhalb der Spalte und die besser definierte Länge der Liganden.

Der untere Teil von Figur 2 zeigt die hypothetische Bindung von Klasse II-Liganden an ihren Rezeptor. Der Ligand ist als Peptidrückgrat in einer langgestreckten Orientierung dargestellt. Der erste hydrophobe Anker ist am α -Ende der Spalte und der letzte am entgegengesetzten Ende. Der zweite Anker ist etwa in der Mitte, wo sich α - und β -Domänen treffen. Somit stimmt der Abstand zwischen dem ersten und dem letzten Anker mit der Länge der Spalte überein. Die relativ konservierten Charakteristiken des ersten Ankers (hydrophob/aromatisch) den unterschiedlichen Allelen können das Fehlen eines verstärkten Polymorphismus in den DNA-Genen widerspiegeln, während der zweite und der letzte Anker dem Einfluß der polymorphen β -Ketten ausgesetzt sind.

- 31 -

Tabelle 8:

HLA-A1-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste									
bzw. Hilfsankerreste	T	D					L		Y
	S	E							
sonstige bevorzugte Reste	L		P	G	G				
			G	N	V				
			I	Y	I				

Beispiele
für Liganden

A T D F K F A M Y
 I A D M G H L K Y
 M I E P R T L Q Y
 Y T S D Y F I S Y
 L T D P G V L D Y

Tabelle 9:

HLA-A3-Motiv

	Position									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ankerreste										
bzw. Hilfsankerreste	L				I	I		K	K	
	V				M	L		Y		
	M				F	M		F		
					V	F				
					T					
					L					
sonstige bevorzugte Reste	I	F		I				Q		
		Y		P				S		
				V				T		
				K				K		

- 32 -

HLA-A11-Motiv

Tabelle 10:

	Position										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ankerreste bzw. Hilfsankerreste		V	M						K	K	K
		I	L								
		F	F								
		Y	Y								
		T	I								
			A								

sonstige
bevorzugte Reste

A		N	P	P	I	L	R	R	R	R	
		D	G	I	V	I	K	D			
		E	D	F	M	Y	N				
		Q	E	V		V	E				
			K	M		F	Q				

Beispiele
für Liganden

A	V	M	K	P	E	A	E	K	R	K	
A	V	I	L	P	P	L	S	P	Y	F	K

Tabelle 11:

HLA-A24-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste bzw. Hilfsankerreste									
	Y		I	F		I			
			V			L			
						F			

sonstige
bevorzugte Reste

N	D	Q	E
E	P	N	K
L			
M			
P			
G			

Tabelle 12:

	<u>HLA-A31-Motiv</u>								
	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste bzw. Hilfsankerreste	L					L			R
	V					F			
	Y					V			
	F					I			
						T			
sonstige bevorzugte Reste	K	T	K	P	P	N	N	L	
	Q	N	D	I	D	V	R		
		F	E	V	E	R	N		
		L	G	F	R	F	Q		
		Y	S	L		T			
		W	V	Y		H			
			T	W		L			
						Y			
Beispiele für Liganden	L	Q	F	P	V	G	R	V	H
	Q	Q	L	Y	W	S	H	P	R
	R	G	Y	R	P	R	F	R	R
	K	V	F	G	P	I	H	E	R
	K	I	M	K	W	N	Y	E	R

Tabelle 13:

	<u>HLA-A33-Motiv</u>								
	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste bzw. Hilfsankerreste		A I L F Y V						R	
besonders bevorzugte Reste		T	L	P	P	I			
		K				L			
						F			
sonstige bevorzugte Reste	E	Q	R	R	R	H	Q		
	M	W	D	I	D	Y	N		
		E	E	F	H	V	E		
		N	G	P	Y	T	M		
			S	V		S			
			H	L					
			P	W					
Beispiele für Liganden	D	M	A	A	Q	I	T	Q	R
	E	S	G	P	S	I	V	H	R
	E	Y	Y	G	S	F	V	T	R
	D	Y	I	H	I	R	I	Q	Q
	E	I	M	K	W	N	R	E	R
	E	V	L	D	I	F	Q	D	R

Tabelle 14:

HLA-B7-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste		P						L	F
sonstige bevorzugte Reste	A	D	D	D	F	L			
	H	E	E	P	T	V			
	S	Q	G	I	R				
		K	H	V	L				
		Y	L		I				
		F	K						
		M	S						
		N	T						
		A	P						

Tabelle 15:

HLA-B8-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste			K		K			L	
					R				
besonders bevorzugte Reste	G	E		N	E	E			
	L	Q		Q	H	Q			
	I			H	M	H			
				I		S			
				L					
				Y					
				V					

sonstige
bevorzugte Reste

D E N L I
H M D V
L S Q D
S T S T
T F T
R Y
G
K

Tabelle 16:

HLA-B*2702-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste		R							F Y I L W
sonstige bevorzugte Reste	K	F	G	I	I	Y	K		
		L	P	K	V	L	V		
		X	K	E	Y	V	D		
			D	V	R	T	E		
			E	M	D	F	R		
			Q	T	H				
			T		E				
			S		Q				
Beispiele für Liganden	S	R	D	K	T	I	I	M	W
	G	R	L	T	K	H	T	K	F
	R	R	F	V	N	V	V	P	T
	K	R	Y	K	S	I	V	K	Y
	K	R	K	K	A	Y	A	D	F
	K	R	G	I	L	T	L	K	Y
	G	R	F	G	V	G	N	R	Y
	G	R	F	K	L	I	V	L	Y

Tabelle 17:

HLA-B*3501-Motiv

	Position									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ankerreste bzw. Hilfsankerreste	P								Y Y	
									F F	
									M M	
									L L	
									I I	

sonstige
bevorzugte Reste

MAI K D I V E
V L D I Q N Q
Y F E V K E V
R V G T V Q T
D M P E L T
E G M K
T L
Y M
N

Tabelle 18:

HLA-B*3503-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste bzw. Hilfsankerreste	P							L	
								M	

sonstige
bevorzugte Reste

A I E G D Q Q F
D L K V E N R
M N H V T
V H I
R

Tabelle 19:

HLA-B37-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste bzw. Hilfsankerreste		D			V			F	I
		E			I			M	L
					A			L	
					M				
sonstige bevorzugte Reste	K	H			T			Q	T
	Q	P			R			K	E
		G			D			Y	N
		S			G			L	D
		L			H			Q	
								G	
								H	

Tabelle 20:

HLA-B38-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste								F	
								L	
sonstige bevorzugte Reste	I	H	I	G	M	V	Y	K	I
		F	A	E	T	I	V	Y	
		P	D	P	V	T	N	N	
		W	E	L	A	K		R	
		Y	S	V	E	R		T	
			N		G	N			
			M		L	H			
			V		K				
					S				

Beispiele
für Liganden

EHAGVISVL
THDELEDKL
QYDEAVAQF
YPDPANGKF

- 39 -

HLA-B*3901-Motiv

Tabelle 21:

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste									
bzw. Hilfsankerreste	R				I				L
	H				V				
					L				

sonstige
bevorzugte Reste

A D V N N S
D E Y Y K
I G I F R
L P L E
F K F T
V T
M G
S K
T N
Y P

Tabelle 22:

HLA-B*3902-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste									
bzw. Hilfsankerreste	K				I				L
	Q				L				
					F				
					V				

sonstige
bevorzugte Reste

K A G N V V T F
A I P E Y L S M
F G T T R
V P H Y
N Q F N
L S I D
T T M H
Y P
E R
H
S

Tabelle 23:

HLA-B*5101-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste									
bzw. Hilfsankerreste		A						F	
		P						I	
		G							

sonstige
bevorzugte Reste

I W I G V N K T W
 L F L V T I Q M
 V M I G L R V
 Y F K A K E
 W E I Q
 Y D S
 V
 E
 H
 D
 R
 N

Beispiele
für Liganden

Y P F K P P K V
 D A H I Y L N H I
 T G Y L N T V T V
 X A Y A L N H T L

- 41 -

Tabelle 24:

HLA-B*5102-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste									
bzw. Hilfsankerreste	P	Y						I	
	A							V	
	G								

sonstige
bevorzugte Reste

F G V I R T
 V E Q N E R
 L K N Q Q Y
 I L G T K
 T T
 Q
 R
 N
 H

Tabelle 25:

HLA-B*5103-Motiv

	Position						
	1	2	3	4	5	6	7
Ankerreste							
oder Hilfsankerreste	A	Y				V	
	P					M	
	G						

sonstige
bevorzugte Reste

F F E G I
 W D L A K
 L N V T
 R N
 G Q
 Q M
 T R
 V

Tabelle 26:

HLA-B*5201-Motiv

	Position							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ankerreste bzw. Hilfsankerreste		Q	F		L		I	
		Y			I		V	
		W			V			
sonstige bevorzugte Reste		V	M	I	L	M	K	K
		L	F	L	I	F	N	E
		I	P	P	V	A	L	Q
			D	P	T	T	Y	
			K	K	G	S		
			E					
			A					
Beispiele für Liganden		T	G	Y	L	N	T	V
		V	Q	T	I	M	P	Q
								L

Tabelle 27:

HLA-B58-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste									
bzw. Hilfsankerreste		A		P	V			F	
		S		E	I			W	
		T		K	L				
					M				
					F				
sonstige									
bevorzugte Reste									
		K	G	D	A	I	L	N	Y
		R		T	Q	D	V	Y	R
		I		I	R	N	L	M	K
				L		T	F	N	T
				V			Y		
				F			W		
				Y			Q		
				N					
				Q					
Beispiele									
für Liganden									
		K	A	G	Q	V	V	T	I
		A	G	D	R	T	F	Q	K

Tabelle 28:

HLA-B60-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste bzw. Hilfsankerreste		E					I		L
							V		

sonstige
bevorzugte Reste

A P L K L K
V K I N Y R
I D V P M Q
L G D V
M N T I
F Q N D
S T P R
D G Q
N K
Q

Beispiele
für Liganden

K E S T L H L
H E A T L R
Y E I H D G M N L

Tabelle 29:

HLA-B61-Motiv

	Position							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Hilfsankerreste	E	F				I		
		I				L		
		L				F		
		V				V		
		Y						
		W						
sonstige bevorzugte Reste	P	M	E	V	N	Y	K	A
	T	G	I			V	S	P
		P	L			L		
		S	M			W		
		N	D			I		
		D	G			T		
		K	V			R		
		A	F			D		
		R	N			Q		
		N	S			G		
		Q	K					
Beispiele für Liganden	G	E	F	G	G	F	G	S
	E	E	F	Q	F	I	K	K
	G	E	F	V	D	L	Y	V

Position									
1	2	3	4	<u>5</u>	6	7	8	9	
	9			I				F	
	L			V				Y	

I MKPGVVY
V AELTTV
NGFGLT
FDTII
P
Y
H
R

V L K P G M V V T F
Y L G E F S I T Y

HLA-B78-Motiv

Position							
1	2	3	4	5	6	7	8
	P				I		A
	A				L		
	G				F		
					V		

Y	E	D	A	K
D	D	G	V	S
W	G	V	N	
	L	N	K	
	V	R	Q	
	S	Q	E	
	Q	S		
	R	T		
	N			

- 47 -

Tabelle 32:

Cw*0301-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste bzw. Hilfsankerreste		V	P		F			L	
		I			Y			F	
		Y						M	
		L						I	
		M							
sonstige bevorzugte Reste	R	E	R	N	M	Q	T		
		N				K			
						S			
						M			

Tabelle 33:

HLA-Cw*0401-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste bzw. Hilfsankerreste		Y			V			L	
		F			I			F	
					L			M	
sonstige bevorzugte Reste	P	D	D	A	X		K		
		H	E	H		A	S		
			P	M		X	H		
			X	T			K		
				R					

Tabelle 34:

HLA-Cw*0602-Motiv

[illegible]

Tabelle 35:

HLA-Cw*0702-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ankerreste bzw. Hilfsankerreste		Y			V	V		Y	
					Y	I		F	
					I	L		L	
					L	M			
					F				
					M				
sonstige bevorzugte Reste		R	P	D	T	A	Y	E	
		D	G	E		R	M	A	
			A	V		N	F		
				Q		R	D		
				P		V	K		
				S		F			
				G		E			
Beispiele für Liganden		K	Y	F	D	E	H	Y	E
		R	Y	R	P	G	T	V	A
		N	K	A	D	V	I	L	K
		I	Y	P	Q	N	V	I	L
		I	R	K	P	Y	I	W	E
		N	Y	G	G	G	N	Y	G
		F	Y	P	P	Y	L		

Tabelle 36:

HLA-Cw4-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker		F							L
		Y							M
									F
stark	F	P	D	E	A	V	A	H	
	Q				M	I	N	K	
						L	E		
							H		
schwach				N	N	R	F	S	Q I
				E	R	T	H	Q	S
				G	D	K	D	D	
					P	F	r	r	
					K	H	N	G	
					Q	M	E	T	
					G		K	Y	
					H		P		
					L		S		
					S				
					T				

Tabelle 37:

HLA-Cw6-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker									L I M V
stark			P	D	I	V	R	K	
			I	E	M	I	N	F	
			F	P	F		Q	Y	
			Y	N				E	
			N						
			D						
schwach	I	P	G	G	L	A	Y	S	
		r	R		V	T	K		
			K		T				
					G				

Tabelle 38:

HLA-Cw7-Motiv

	Position								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker		Y							L F Y M
stark				P	D	Y	Y		
				F	E	K	I		
					P		V		
schwach				P	N		I	T	M
				I	G		F	A	F
					R		V		Y
							A		V
							M		D

Demnach haben HLA- Cw4-, Cw6- und Cw7-Liganden folgende Eigenschaften:

- 1.) Überwiegende Länge von 9 Aminosäuren (längere und kürzere Peptide können vorkommen)
- 2.) Überwiegend aromatische Reste F oder Y an Position 2
- 3.) Überwiegend hydrophobe Reste V, I, L, F, A an Position 6 ("Hilfsanker")
- 4.) Hydrophobe Reste L, F, Y, M, V am C-Terminus

Individuelle Unterschiede der Liganden-Spezifität von Cw4, Cw6, und Cw7 gehen aus den Tabellen hervor.

Tabelle 39:

HLA-DRB1*0101-Motiv

	Relative Position										
	-10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ankerreste											
		Y		L					L		
		V		A					A		
		L		I					I		
		F		V					V		
		I		M					N		
		A		N					F		
		M							Y		
		W									

bevorzugte Reste,
polar oder geladen

K	KK	E	HH	K
Q	DD	Q	RR	R
E	EE	D	DD	Q
N	RR	H	QQ	D
D	HH	R		
R				
H				

bevorzugte
kleine Reste

AA	SS	SS	SS
TS	TG	TT	
	PP	SP	
		T	
		P	

Tabelle 41:

HLA-DR4w14-Motiv

Relative Position
-10 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Ankerreste

I		F		I
L		Y		V
M		I		L
V		V		M
Y		L		Y
F		M		A

bevorzugte Reste,
polar oder geladen

H	K	QDD
Q	R	NHH
N	Q	EQQ
E	N	DNN
D	H	
Q		
R		

bevorzugte
kleine Reste

A	GTA
	TS

Beispiele
für Liganden

G	S	A	S	M	R	Y	F	H	T	A	M	S	R	P	G	R	G	E	F
V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R	M	E	P
Y	D	N	S	L	K	I	I	S	N	A	S	X	T	T	N				

Tabelle 43:

HLA-DRw52-Motiv

	Relative Position										
	-10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ankerreste		F		N		L					
		I		L		Y					
		L		V		I					
		Y		I		V					
		M		Y							
		A		A							

sonstige
bevorzugte Reste

EA	AA	AT	E
KT		EG	K
Q		RK	Q
N			

Beispiele
für Liganden

S	L	Q	F	G	Y	N	T	G	V	I	N	A	P	Q
S	S	V	I	I	L	N	T	N	V	G	L	Y	X	Q
			N	F	E	R	N	K	A	I	K	V	I	
		V	T	R	Y	I	Y	N	R	E	E	Y	A	R
		V	V	A	P	F	M	A	N	I	P	L	L	Y

Tabelle 44:

		<u>HLA-DPw2-Motiv</u>																					
		Relative Position																					
		-10	1	2	3	4	5	6	7	8	9												
Ankerreste																							
			F				F			I													
			L				L			A													
			M				M			M													
			V				Y			V													
			W																				
			Y																				
bevorzugte Reste, polar oder geladen																							
			R			D	N			N													
			N			H	D			Q													
			Q			Q	H			H													
			H			R	K			R													
			K																				
			E																				
bevorzugte kleine Reste																							
						S				S													
						A				T													
						T				A													
Beispiele für Liganden																							
						<u>L</u>	F	R	<u>K</u>	<u>F</u>	H	<u>Y</u>	<u>L</u>	P	F	L	P	S	T	E	D	V	
			L	P	R	E	<u>D</u>	H	<u>L</u>	F	R	<u>K</u>	<u>F</u>	H	<u>Y</u>	<u>L</u>	P	F	L	P	S		
			V	T	N	K	<u>F</u>	P	T	Q	L	F	H	T	I	G	V	E					
			A	D	E	K	<u>K</u>	F	<u>W</u>	G	K	Y	<u>L</u>	Y	E	I	A	R	R	H	P		
			D	S	F	K	<u>L</u>	Q	T	K	<u>E</u>	F	<u>Q</u>	<u>V</u>	L	K	S	L	G				
			G	<u>E</u>	P	L	S	Y	T	R	F	S	<u>L</u>	A	R	Q	V	D	G				

Tabelle 45

HLA-DQB1*0301-Motiv

-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		F				V		Y				
		Y				L		F				
		I				I		M				
		M				M		L				
		L				Y		V				
								I				

**bevorzugte Reste,
polar oder geladen**

H D Q N K R

N H Q E K

Q H N K R

D K E N Q

**bevorzugte
kleine Reste**

A G T S P
A G T S
A G T S
A S P
G T S P
T T

Beispiele für Liganden

K K P P K P U
 D S
 T V E M
 B B V R
 L L V M
 L Y M
 M B A
 G A T
 A V P
 L T L
 P P L
 M L M
 G G Q
 A P A
 L P Q

Tabelle 46:

<u>HLA-DPB1*0401-Motiv</u>																				
	Relative Position																			
	-10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10									
Ankerreste		F					F		V											
		L					L		Y											
		Y					Y		I											
		M					M		A											
		I					V		L											
		V					I													
		A					A													
bevorzugte Reste, polar oder geladen		K					N													
		R					K													
		E					E													
		N																		
		Q																		
bevorzugte kleine Reste						A														
						V														
Beispiele für Liganden	X	K	K	Y	F	A	A	T	Q	F	E	P	Y	N	N					
	G	P	G	A	P	A	D	V	Q	Y	D	L	Y	L	N	V	A	N	R	R

Relative Position

Ankerreste

sonstige
bevorzugte Reste

DT LRSYYADWYQQKPG
EKTLDIDRFEP L

Tabelle 48a:

HLA-DR1-Motiv

[illegible]

Tabelle 48b:

Interpretation:
HLA-DR1-Motiv

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

P

E	N	D							M	M	M
D	K	Q							A	A	
N	D	N							L		
E	E										
Q											

I	F	F	I
L	Y	Y	M
M	A	I	A
F	L	A	V
M	L		
V			

Demnach haben natürliche DR1-Liganden folgende Eigenschaften:

- 1.) Länge überwiegend mehr als 11 Aminosäuren (ist bereits bekannt)
- 2.) Überwiegend P an zweiter Position
- 3.) Polare/geladene Reste E, D, K, N, K, Q an Position 2, 3 oder 4
- 4.) Hydrophobe Reste I, L, M, F, A an Position 3, 4, 5 oder 6
- 5.) Hydrophobe Reste M, A oder L an Position 9, 10 oder 11

HLA-DR3-Motiv

P

```

A   R D D D R Q R L L T F F S A
I   Q F L Q D K K N E Y L K T
P   L L S K K r S K Q L Y y H
V   F A t S Q D E   F G
    G I y Y H T Y   A
    H M Q M   N N
    D T I P   E d
    I R F   G H
      E
      Q
      G
      y

```

Tabelle 49b:

Interpretation:

HLA-DR3-Motiv

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

P

```

L F L
F L I
I I Y
Y F
M
A

```

```

L Y F F
F L L Y
A Y

```

```

D D D D Q D
R Q K K K K
E Q Q R R
Q R E E
H N
H

```

Demnach haben natürliche DR3-Liganden folgende Eigenschaften:

- 1.) wie bei DR1
- 2.) wie bei DR1
- 3.) Hydrophobe Reste L, F, I, Y, M, A an Position 3, 4 oder 5
- 4.) Polare/geladene Reste an Position 4, 5, 6, 7, 8 oder 9
- 5.) Hydrophobe Reste L, F, A, Y an Position 11, 12 oder 13

Tabelle 50a:

HLA-DR5-Motiv

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Sehr stark

P

stark

```

N D N R R R R P N R m D A i
g N D I N N N i D E Q M P
E E L Q L L v E q Y Y
L G F L A d A M r F
T I t K q E Y V
Y L Y A M G V P
H K V H v h p
V M a M k q
F n S a
Y K r
V H
H
r

```

Tabelle 50b:

Interpretation:

HLA-DR5-Motiv

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

P

```

N D D R R R R   N R
  E E K N N N   D E
  N N n Q q d   E Q
  H K   K       Q
    H   H

```

```

L L L L L L
Y Y Y M
  I I
  M V
  F F
  V

```

Demnach haben natürliche DR5-Liganden folgende Eigenschaften:

- 1.) wie DR1
- 2.) wie DR1
- 3.) Polare/überwiegend negativ geladene Reste N, D, E, H, K an Position 2, 3 oder 4
- 4.) Polare/überwiegend positiv geladene Reste R, K, N, Q an Position 5, 6, 7 oder 8
- 5.) Hydrophobe Reste L, Y, V, I, M, F, A an Position 3, 4 oder 5 sowie an 5, 6 oder 7
- 6.) Polare/geladene Reste N, D, E, H, R, Q an Position 10, 11 oder 12

Literaturstellen

1. Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C., *Nature* 248, 701-702 (1974).
2. Townsend, A.R. et al., *Cell* 44, 959-968 (1986).
3. Bjorkman, P.J. et al., *Nature* 329, 512-518 (1987).
4. Röttschke, O. et al., *Nature* 348, 252-254 (1990).
5. VanBleck, G.M. & Nathenson, S.G., *Nature* 348, 213-216 (1990).
6. Garrett, T.P.J., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, J.L. & Wiley, D.C., *Nature* 343, 692-696 (1989).
7. Röttschke, O., Falk, K., Wallny, H.-J., Faath, S. & Rammensee, H.-G., *Science* 249, 283-287 (1990).
8. Falk, K., Röttschke, O. & Rammensee, H.-G., *Nature* 348, 248-251 (1990).
9. Shimorkevitz, R., Kappler, J., Marrack, P. & Grey H., *J.exp.Med.* 158, 303-316 (1983).
10. Demotz, S., Grey, H.M., Appella, E. & Sette, A., *Nature* 343, 682-684 (1989).
11. Bjorkman, P.J. et al., *Nature* 329, 506-512 (1987).
12. DeLisi, C. & Berzolsky, J.A., *Proc.natn.Acad.Sci.USA* 82, 7048-7052 (1985).
13. Rothbard, J.B. & Taylor, W.R., *EMBO J.* 7, 93-100 (1988).
14. Cornette, J.L., Margaht, H., DeLisi, C. & Berzolsky, J.A., *Meth.Enzym* 178, 611-633 (1989).
15. Sette, A. et al., *Proc.natn.Acad.Sci.USA* 86, 3296-3300 (1989).
16. Maryanski, J.L., Verdini, A.S., Weber, P.C., Salemme, F.R. & Corradin, G., *Cell* 60, 63-72 (1990).
17. Bastin, J., Rothbard, J. Davey, J. Jones, I. & Townsend, A., *J.exp.Med.* 165, 1508-1523 (1987).
18. Bjorkman, P.J. & Davis, M.M., *Cold Spring Harb.Symp. quant.Biol.* 54, 365-374 (1989).
19. Boulliot, M. et al., *Nature* 339, 473-475 (1989).
20. Frelinger, J.A., Gotch, F.M., Zweerink, E., Wain, E. & McMichael, A.J., *J.exp.Med.* 172, 827-834 (1990).
21. Schild, H., Röttschke, O., Kalbacher, H. & Rammensee, H.-G., *Science* 247, 1587-1589 (1990).
22. Townsend, A. et al., *Nature* 340, 443-448 (1989).
23. Elliott, T., Townsend, A. & Cerundolo, V., *Nature* 348, 195-197 (1990).
24. Cerundolo, V. et al., *Nature* 345, 449-452 (1990).
25. Rüsch, E., Kuon, W. & Hämmerling, G., *J.Trans.Proc.* 15, 2093-2096 (1983).
26. Lembke, H., Hämmerling, G.J. & Hämmerling U., *Immunol.Rev.* 47, 175-206 (1979).
27. Ozato, K. & Sachs, D.H., *J.Immun.* 126, 317-321 (1981).
28. Parham, P. & Brodsky, F.M., *Hum.Immun.* 3, 277-299 (1981).
29. Taylor, P.M., Davey, J., Howland, K., Rothbard, J.B. & Ask nas, B.A., *Immunogenetics* 26, 267-272 (1987).

30. Braciale, T.J. et al., J.exp.Med. 166, 678-692 (1987).
31. Braciale, T.J., Sweetser, M.T., Morrison, L.A., Kittlesen, D.J. & Braciale, V.L., Proc.natn.Acad.Sci.USA 86, 277-281 (1989).
32. Kuwano, K., Braciale, T.J. & Ennis, F.A., FASEB J. 2, 2221 (1988).
33. Maryanski, J.L., Pala, P., Cerottini, J.C. & Corradin, G.J., J.Exp.Med. 167, 1391-1405 (1988).
34. Maryanski, J.L., Pala, P., Corradin, G., Jordan, B.R. & Cerottini, J.C., Nature 324, 578-579 (1986).
35. Sibille, C. et al., J.exp.Med. 172, 35-45 (1990).
36. Romero, P. et al., Nature 341, 323-326 (1989).
37. Weiss, W.R. et al., J.exp.Med. 171, 763-773 (1990).
38. Kast, W.M. et al., Cell 59, 603-614 (1989).
39. Oldstone, M.B.A., Whitton, J.L., Lewicki, H. & Tishon, A., J.exp.Med. 168, 559-570 (1988).
40. Tevethia, S.S. et al., J.Virol. 64, 1192-1200 (1990).
41. Carbone, F.R. & Bevan, M.J., J.exp.Med. 169, 603-612 (1989).
42. Schumacher, T.N.M. et al., Cell 62, 563-567 (1990).
43. Walker, B.D. et al., Proc.natn.Acad.Sci.USA 86, 9514-9518 (1989).
44. Gotch, F., McMichael, A. & Rothbard, J., J.exp.Med. 168, 2045-2057 (1988).
45. Santos-Aguado, J., Commins, M.A.V., Mentzer, S.J., Burakoff, S.J. & Strominger, J.L., Proc.natn.Acad.Sci.USA 86, 8936-8940 (1989).
46. Clavene, J.M. et al., Eur.J.Immun. 18, 1547-1553 (1988).
47. Falk, K. et al., J.exp.Med. A4, 425-434 (1991).

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Bestimmung von allelspezifischen Peptidmotiven auf Molekülen des Major Histocompatibility Complex (MHC) der Klassen I oder II, wobei man
 - (a) durch Zellaufschluß von Zellen, die MHC-Moleküle enthalten, einen Zellextrakt erzeugt,
 - (b) MHC-Moleküle mit den darauf befindlichen Peptidmischungen durch Immunpräzipitation aus dem Zellextrakt abtrennt,
 - (c) die Peptidmischungen von MHC-Molekülen und sonstigen Proteinbestandteilen abtrennt,
 - (d) einzelne Peptide oder/und ein Gemisch davon sequenziert, und
 - (e) aus den erhaltenen Informationen, insbesondere aus der Sequenzierung eines Gemisches, oder aus der Sequenzierung einer Reihe von Einzelpeptiden, das allelspezifische Peptidmotiv ableitet,d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man Peptidmotive auf Molekülen bestimmt, die aus der Gruppe, bestehend aus HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11, HLA-A24, HLA-A31, HLA-A33, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B*2702, HLA-B*3501, HLA-B*3503, HLA-B37, HLA-B38, HLA-B*3901, HLA-B*3902, HLA-B*5101, HLA-B*5102, HLA-B*5103, HLA-B*5201, HLA-B58, HLA-B60, HLA-B61, HLA-B62, HLA-B78, HLA-Cw*0301, HLA-Cw*0401, HLA-Cw*0602, HLA-Cw*0702, HLA-Cw4, HLA-Cw6, HLA-Cw7, HLA-DRB1*0101, DRB1*1201, HLA-DR4w14, HLA-DR17, HLA-DRw52, HLA-DPw2, HLA-DPB1*0401, HLA-DQB1*0301, HLA-DQw1, HLA-DR1, HLA-DR3 und HLA-DR5 ausgewählt sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man für die Immunpräzipitation Antikörper verwendet, die für MHC-Moleküle spezifisch sind.

3. Verfahren nach Anspruch 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man Festphasen-gebundene Antikörper verwendet.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Abtrennung der Peptidmischungen von MHC-Molekü-
len und sonstigen Proteinbestandteilen chromatographisch
erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 4,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Abtrennung über Reverse Phase-HPLC erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Abtrennung in einem Trifluoressigsäure/H₂O-Tri-
fluoressigsäure/Acetonitril-Gradienten erfolgt.
7. Peptidmotiv, erhältlich durch ein Verfahren nach einem
der Ansprüche 1 bis 6.
8. Verwendung eines Peptidmotivs nach Anspruch 7 bei einem
Verfahren zur Herstellung eines diagnostischen oder
therapeutischen Mittels.
9. Verwendung nach Anspruch 8 für den diagnostischen Nach-
weis von MHC-Molekülen.
10. Verwendung nach Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man ein Peptid, das einem Peptidmotiv entspricht,
mit einer Markierungsgruppe, insbesondere einer Biotin-
oder einer Fluoreszenzgruppe koppelt.

11. Verwendung nach Anspruch 9 für die Therapie von Störungen des Immunsystems oder von Tumorerkrankungen.
12. Verwendung nach Anspruch 11 für die Therapie von Autoimmunkrankheiten, Transplantatabstoßungen oder/und Graft-versus-Host-Reaktionen.
13. Verwendung nach Anspruch 8 oder 12,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß ein Peptid, das einem Peptidmotiv entspricht, N-
oder/und C-terminal mit lipophilen bzw. amphiphilen
Gruppen, insbesondere auch lipophilen Peptid-Helices
kovalent verküpft wird.
14. Verwendung nach Anspruch 13,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die lipophile bzw. amphiphile Gruppe Tripalmitoyl-S-
glycerylcysteiny-l-serylserin ist.

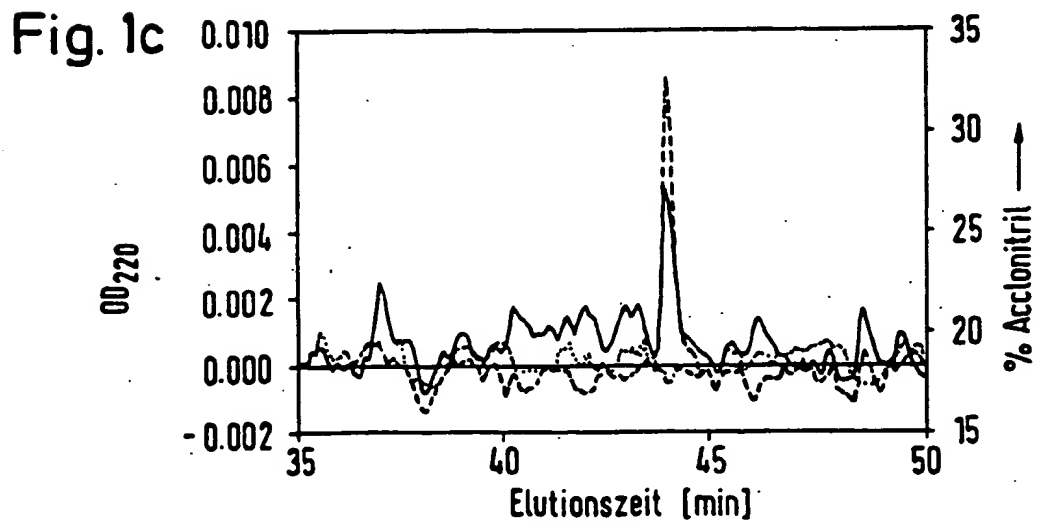
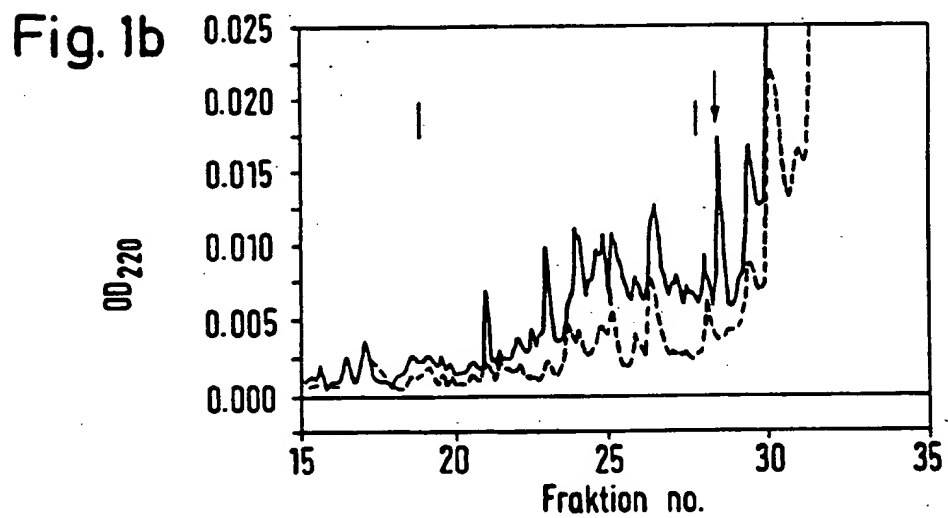
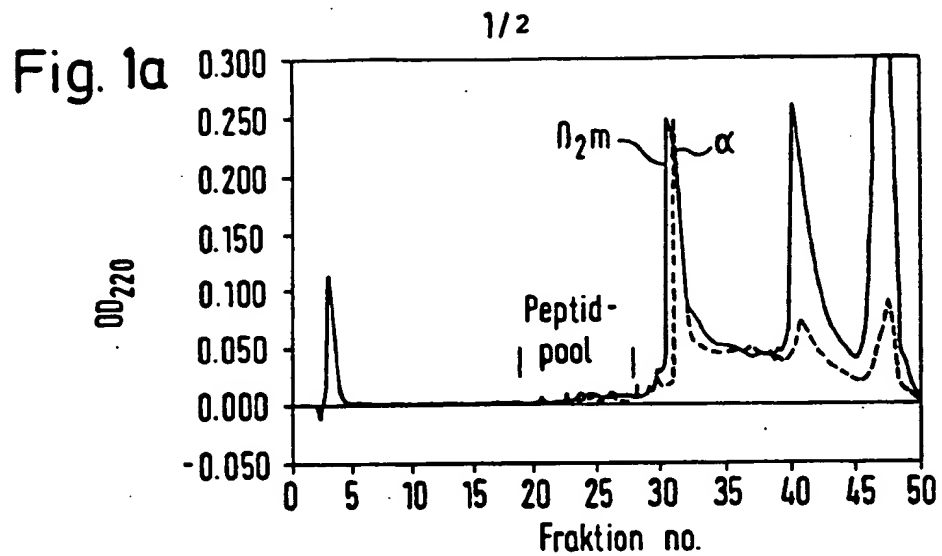
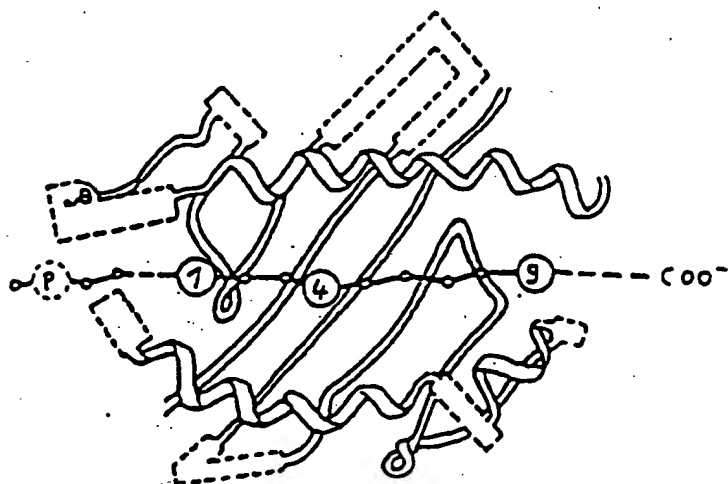
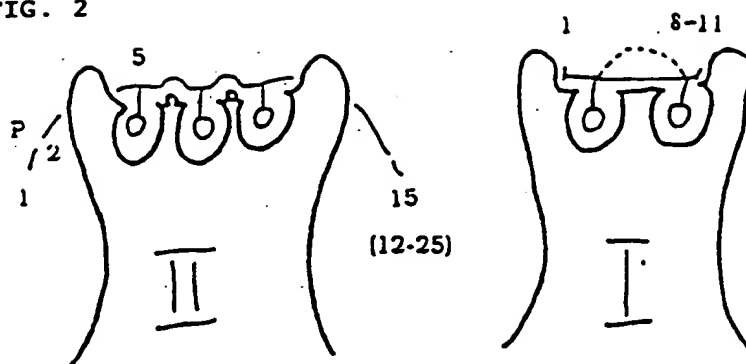


FIG. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 93/03175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 5 G01N33/68 G01N33/564 C07K7/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PEPTIDES: CHEMISTRY AND BIOLOGY. PROCEEDINGS OF THE 12TH. AMERICAN PEPTIDE SYMPOSIUM. 21 June 1991, CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, USA pages 832 - 834 OLAF RÖTZSCHKE ET AL. 'Sequence motifs of peptides eluted from MHC molecules are allele specific' see the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 1994

Date of mailing of the international search report

16.03.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Td. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Doepfer, K-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 93/03175

C(Commission) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>NATURE. vol. 351, no. 6324 , 23 May 1991 , LONDON GB pages 290 - 296 KIRSTEN FALK, OLAF RÖTZSCHKE ET AL. 'Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules' see the whole document</p>	1-14
P,X	<p>WO,A,92 21033 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 26 November 1992 see the whole document</p>	1-14
X	<p>EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 21, no. 11 , November 1991 , WEINHEIM, DE pages 2891 - 2894 OLAF RÖTZSCHKE ET AL. 'Exact prediction of natural T cell epitope' see the whole document</p>	1-14
X	<p>JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE vol. 175 , June 1992 , NEW YORK, NY, USA pages 1799 - 1803 HARALD KROPSHOFER ET AL. 'Self -Peptide Released from Class II HLA-DR1 Exhibits a Hydrophobic Two-Residue Contact Motif' see the whole document</p>	1-14
A	<p>JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE vol. 174 , August 1991 , NEW YORK, NY, USA pages 425 - 436 KIRSTEN FALK, OLAF RÖTZSCHKE ET AL. 'Identification of Naturally Processed Viral Nonapeptides Allows Their Quantification in Infected Cells and Suggests an Allele-specific T Cell Epitope Forecast' see the whole document</p>	1-5
A	<p>WO,A,88 05784 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 11 August 1988 see page 13, line 22 - page 21, line 2</p>	1-14

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 93/03175

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE vol. 175 , April 1992 , NEW YORK, NY, USA pages 961 - 971 R. PAUL JOHNSON ET AL. 'Identification of Overlapping HLA Class I-restricted Cytotoxic T Cell Epitopes in a Conserved Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein: Definition of Minimum Epitopes and Analysis of the Effects of Sequence Variation' see abstract</p>	1-14
A	<p>JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE vol. 175 , March 1992 , NEW YORK, NY, US pages 809 - 820 SARAH E. BUXTON ET AL. 'Anchoring Pockets in Human Histocompatibility Complex Leukocyte Antigen (HLA) Class I Molecules: Analysis of the Conserved B ("45") Pocket of HLA-B27' see abstract</p>	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 93/03175

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9221033	26-11-92	DE-A- 4116256 AU-A- 1694392	19-11-92 30-12-92
WO-A-8805784	11-08-88	AU-B- 619458 AU-A- 1342388 EP-A- 0365525	30-01-92 24-08-88 02-05-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Abkürzungen

PCT/EP 93/03175

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 5 G01N33/68 G01N33/564 C07K7/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfobjekt (Klassifikationssystem und Klassifikations-symbole)
IPK 5 G01N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfobjekt gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------

X	<p>PEPTIDES: CHEMISTRY AND BIOLOGY. PROCEEDINGS OF THE 12TH. AMERICAN PEPTIDE SYMPOSIUM. 21. Juni 1991, CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, USA Seiten 832 - 834 OLAF RÖTZSCHKE ET AL. 'Sequence motifs of peptides eluted from MHC molecules are allele specific' siehe das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-14
---	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam angesehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Beratung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der für zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Februar 1994

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

16.03.94

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5111 Patentlaan 2
NL - 2210 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bvollmächtigter Beauftragter

Doepfer, K-P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. malen Aktenzeichen

PCT/EP 93/03175

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NATURE. Bd. 351, Nr. 6324 , 23. Mai 1991 , LONDON GB Seiten 290 - 296 KIRSTEN FALK, OLAF RÖTZSCHKE ET AL. 'Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules' siehe das ganze Dokument	1-14
P,X	WO,A,92 21033 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 26. November 1992 siehe das ganze Dokument	1-14
X	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY Bd. 21, Nr. 11 , November 1991 , WEINHEIM, DE Seiten 2891 - 2894 OLAF RÖTZSCHKE ET AL. 'Exact prediction of natural T cell epitope' siehe das ganze Dokument	1-14
X	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE Bd. 175 , Juni 1992 , NEW YORK, NY, USA Seiten 1799 - 1803 HARALD KROPSHOFER ET AL. 'Self -Peptide Released from Class II HLA-DR1 Exhibits a Hydrophobic Two-Residue Contact Motif' siehe das ganze Dokument	1-14
A	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE Bd. 174 , August 1991 , NEW YORK, NY, USA Seiten 425 - 436 KIRSTEN FALK, OLAF RÖTZSCHKE ET AL. 'Identification of Naturally Processed Viral Nonapeptides Allows Their Quantification in Infected Cells and Suggests an Allele-specific T Cell Epitope Forecast' siehe das ganze Dokument	1-5
A	WO,A,88 05784 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 11. August 1988 siehe Seite 13, Zeile 22 - Seite 21, Zeile 2	1-14

-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter velle Alamanico

PCT/EP 93/03175

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE Bd. 175 , April 1992 , NEW YORK, NY, USA Seiten 961 - 971 R. PAUL JOHNSON ET AL. 'Identification of Overlapping HLA Class I-restricted Cytotoxic T Cell Epitopes in a Conserved Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein: Definition of Minimum Epitopes and Analysis of the Effects of Sequence Variation' siehe Zusammenfassung ---</p>	1-14
A	<p>JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE Bd. 175 , März 1992 , NEW YORK, NY, US Seiten 809 - 820 SARAH E. BUXTON ET AL. 'Anchoring Pockets in Human Histocompatibility Complex Leukocyte Antigen (HLA) Class I Molecules: Analysis of the Conserved B ("45") Pocket of HLA-B27' siehe Zusammenfassung -----</p>	1-5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Abrechnung

PCT/EP 93/03175

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9221033	26-11-92	DE-A- 4116256	19-11-92
		AU-A- 1694392	30-12-92
WO-A-8805784	11-08-88	AU-B- 619458	30-01-92
		AU-A- 1342388	24-08-88
		EP-A- 0365525	02-05-90